
Ex-vivo konfokale Laserscanmikroskopie: Merkmale der gesunden Haut und verschiedener Hauttumoren im Vergleich mit der konventionellen Histologie

Leonie Mathemeier



München 2016

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. T. Ruzicka

**Ex-vivo konfokale Laserscanmikroskopie: Merkmale der
gesunden Haut und verschiedener Hauttumoren im Vergleich mit
der konventionellen Histologie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Leonie Mathemeier

aus München

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatterin:	PD Dr. Tanja von Braunmühl
Mitberichterstatterin:	Prof. Dr. Elisabeth Messmer
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. Daniela Hartmann, Ph.D.
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	14.12.2016

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Leonie Mathemeier, erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Ex-vivo konfokale Laserscanmikroskopie: Merkmale der gesunden Haut und verschiedener Hauttumoren im Vergleich mit der konventionellen Histologie

selbstständig verfasst, mich außer der angegeben keiner weiteren Hilfsmittel bedient und aller Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form in einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 14. Dezember 2016

Leonie Mathemeier

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen herzlich bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Dissertation begleitet und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Frau Dr. Tanja von Braunmühl möchte ich für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation an der Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilian-Universität München danken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. Daniela Hartmann, die mich optimal in das Themengebiet eingeführt hat und alle aufkommenden Fragen mit großer Geduld und Sachkenntnis beantwortet hat. Während der gesamten Dauer dieser Arbeit hat sie mich professionell, kompetent und freundschaftlich betreut und war stets offen für konstruktive Gespräche. Ihre wertvollen Ratschläge halfen immer wieder die Arbeit voranzutreiben.

Natürlich möchte ich ebenso meinen Eltern Annegret und Wilfried Mathemeier für die außerordentliche Unterstützung während meines Studiums danken sowie für die stets inspirierenden Diskussionen. Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinem Lebenspartner Martin Kleehaus für die motivierenden Worte und die Hilfe bei allen auftretenden IT-Problemen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	ix
Abbildungsverzeichnis	xi
Tabellenverzeichnis	xv
Abkürzungsverzeichnis	xvii
1 Einleitung	1
1.1 Problemstellung der Arbeit	1
1.2 Zielsetzung der Arbeit	2
1.3 Aufbau der Arbeit	2
2 Einführung in die Grundlagen der Histologie der gesunden Haut und in die Pathologie verschiedener Hauterkrankungen	3
2.1 Gesunde Haut	3
2.2 Benigne Veränderungen der Haut	6
2.2.1 Virusassoziierte Hautveränderungen	6
2.2.2 Benigne nicht-melanozytäre Hautveränderungen	7
2.2.3 Melanozytäre Hautveränderungen	8
2.3 Präkanzerosen	12
2.3.1 Aktnische Keratose	12
2.3.2 Morbus Bowen	14
2.4 Semimaligner Tumor – Basalzellkarzinom	15
2.5 Maligne Tumoren	18
2.5.1 Plattenepithelkarzinom der Haut	18
2.5.2 Malignes Melanom	21
3 Die ex-vivo konfokale Laserscanmikroskopie	25
3.1 Das konfokale Prinzip	25
3.2 Der Strahlengang des konfokalen Mikroskops	26
3.3 Die Abbildung optischer Schnitte	27
3.4 Der Reflexionsmodus	27
3.5 Der Fluoreszenzmodus	28

4	Material und Methoden	29
4.1	Die Gewinnung der Gewebeproben	29
4.2	Die Vorbehandlung der Präparate	30
4.2.1	Das Schneiden der Präparate	30
4.2.2	Die Färbung des Gewebes	30
4.2.3	Die Fixierung der Präparate auf dem Objektträger	31
4.3	Das ex-vivo konfokale Laserscanmikroskop	32
4.3.1	Technische Daten des Mikroskops	33
4.3.2	Software des Mikroskops	34
4.4	Die Nachbehandlung der Präparate	35
4.5	Der Zeitaufwand	35
4.6	Die Archivierung der Daten	35
4.7	Die Auswertung der Daten und Aufnahmen	36
5	Ergebnisse	37
5.1	Explorative Auswertung der Daten	37
5.2	Aufnahmen der gesunden Haut in der KLM	41
5.2.1	Aufbau und morphologische Eigenschaften der gesunden Haut . . .	41
5.2.2	Vergleich verschiedener Färbungen der gesunden Haut	51
5.2.3	Vergleich der Eigenschaften der einzelnen Schichten der gesunden Haut in der ex-vivo KLM und der konventionellen Histologie	52
5.3	Aufnahmen der Artefakte in der KLM	54
5.4	Aufnahmen benigner Hautveränderungen in der KLM	61
5.4.1	Virusassoziierte Hautveränderungen	61
5.4.2	Benigne nicht-melanozytäre Hautveränderungen	66
5.4.3	Melanozytäre Hautveränderungen	73
5.5	Aufnahmen der Präkanzerosen in der KLM	83
5.5.1	Aktinische Keratose	83
5.5.2	Morbus Bowen	87
5.6	Aufnahmen semimaligner Tumoren in der KLM	89
5.7	Aufnahmen maligner Tumoren in der KLM	96
5.7.1	Plattenepithelkarzinom der Haut	96
5.7.2	Malignes Melanom	105
6	Diskussion	113
6.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	113
6.2	Diskussion der Methoden	114
6.3	Diskussion der Ergebnisse	117
7	Zusammenfassung	127
	Literaturverzeichnis	129

Abbildungsverzeichnis

1	Strahlengang eines konfokalen Mikroskops	27
2	Zum Scannen vorbereitetes Präparat (gelb), fixiert mit <i>Blu Tak®</i> (weiß) . . .	32
3	Vivascope 2500®(Caliber I.D., Lucid Inc., Rochester NY)	33
4	Clusterung der Altersgruppen der Patienten	37
5	Häufigkeit der verschiedenen Hautveränderungen	38
6	Häufigkeit der Lokalisation der untersuchten Läsionen	38
7	Übersichtsdarstellung der gesunden Haut. Färbung: Acridine Orange . . .	41
8	Schichten der Epidermis. Färbung: Acridine Orange	42
9	<i>Stratum corneum</i> der Epidermis. Färbung: Acridine Orange	42
10	Keratinocyten im <i>Stratum corneum</i> im FM (a) und Melanozyten im <i>Stratum basale</i> im FM (b). Färbung: Acridine Orange	43
11	Dermoepidermale Junktionszone. Färbung: Acridine Orange	43
12	Aufbau der Schichten der Dermis. Färbung: Acridine Orange	44
13	Kollagene Fasern. Färbung: Acridine Orange	44
14	Aufbau eines Haarfollikels. Färbung Acridine Orange	45
15	Aufbau einer holokrinen Talgdrüse. Färbung Acridine Orange	46
16	Aufbau einer ekkrinen Schweißdrüse. Färbung: Acridine Orange	46
17	Fettgewebe der gesunden Haut. Färbung Acridine Orange	47
18	Fettvakuolen der Subkutis im FM. Färbung Acridine Orange	48
19	Quergestreifte Muskulatur quer angeschnitten. Färbung: Acridine Orange .	48
20	Quergestreifte Muskulatur längs angeschnitten mit Darstellung der Sarkomere. Färbung: Acridine Orange	49
21	Quer und längs angeschnittener Nerv. Färbung: Acridine Orange	50
22	Quer angeschnittenes Gefäß. Färbung: Acridine Orange	50
23	Präparat der gesunden Haut in Acridine Orange.	51
24	Präparat der gesunden Haut in Fluorescein.	51
25	Präparate der gesunden Haut mit einem Silikontropfen im RM. Färbung: Acridine Orange	54
26	Unscharfes Präparat der gesunden Haut, das mit einer zu großen Menge Silikon fixiert wurde im RM. Färbung: Acridine Orange	55
27	Fasern einer Kompresse in einem Präparat der gesunden Haut. Färbung Acridine Orange	55

28	Ungefärbte Seite eines Präparats der gesunden Haut im RM. Färbung: Acridine Orange	56
29	Ohne Ultraschallgel gescanntes Präparat der gesunden Haut. Färbung: Acridine Orange	56
30	Zu dickes Präparat der gesunden Haut. Färbung: Acridine Orange	57
31	Präparat der gesunden Haut in Formalin. Färbung: Acridine Orange	57
32	Präparat der gesunden Haut, das am Operationstag eingefroren und am Folgetag aufgetaut wurde. Färbung: Acridine Orange	58
33	Ausgetrocknetes Präparat der gesunden Haut mit sichtbarer Spaltbildung. Färbung: Acridine Orange	59
34	Übersichtsaufnahme einer Verruca vulgaris. Färbung: Acridine Orange	61
35	Dermale Papillen einer Verruca vulgaris. Färbung: Acridine Orange	61
36	Übersichtsaufnahme eines Kondyloms. Färbung: Acridine Orange	62
37	Ausschnitt der Epidermis eines Kondyloms. Färbung: Acridine Orange	62
38	Koilozyten eines Kondyloms. Färbung: Acridine Orange	63
39	Übersichtsaufnahme eines Molluscum contagiosum. Färbung: Acridine Orange	64
40	Ausschnitt eines Molluscum contagiosum. Färbung: Acridine Orange	64
41	Stark vergrößerter Ausschnitt eines Molluscum contagiosum. Färbung: Acridine Orange	65
42	Übersichtsaufnahme einer Verruca seborrhoea. Färbung: Acridine Orange	66
43	Epidermis einer Verruca seborrhoea. Färbung: Acridine Orange	66
44	Epithelhyperplasie einer Verruca seborrhoea. Färbung: Acridine Orange	67
45	Keratinmassen der Pseudohornzysten einer Verruca seborrhoea. Färbung: Acridine Orange	67
46	Übersichtsaufnahme einer Narbe. Färbung: Acridine Orange	68
47	Übergang von Narbengewebe zur gesunden Haut bei der Akne inversa. Färbung: Acridine Orange	68
48	Narbengewebe der Akne inversa. Färbung: Acridine Orange	69
49	Übersichtsaufnahme eines Lipoms. Färbung: Acridine Orange	69
50	Fettzellen eines Lipoms. Färbung: Acridine Orange	70
51	Übersichtsaufnahme eines Fibroma molle. Färbung: Acridine Orange	70
52	Ausschnitt eines Fibroma molle. Färbung: Acridine Orange	71
53	Übersichtsaufnahme eines Neurofibroms. Färbung: Acridine Orange	71
54	Vergrößerter Ausschnitt eines Neurofibroms. Färbung: Acridine Orange	72
55	Übersichtsaufnahme eines Nävus vom Junktionstyp. Färbung: Acridine Orange	73
56	Epidermis und DEJ im zentralen Anteil eines Nävus vom Junktionstyp. Färbung: Acridine Orange	73
57	Epidermis und DEJ im peripheren Anteil eines Nävus vom Junktionstyp. Färbung: Acridine Orange	74

58	Epidermis und Dermis eines Nävus vom Compoundtyp. Färbung: Acridine Orange	75
59	Epidermis und melanozytäre Nester eines Nävus vom Compoundtyp. Färbung: Acridine Orange	75
60	Übersichtsaufnahme eines Nävus vom Compoundtyp mit schräg angeschnittener Epidermis. Färbung: Acridine Orange	76
61	Schräg angeschnittene Epidermis eines Nävus vom Compoundtyp. Färbung: Acridine Orange	76
62	Übersichtsaufnahme eines dermalen Nävus mit ausgeprägten melanozytären Nestern. Färbung: Acridine Orange	77
63	Übersichtsaufnahme eines dermalen Nävus. Färbung: Acridine Orange	77
64	Melanozytäre Nester eines dermalen Nävus, welche einen Haarfollikel umgeben. Färbung: Acridine Orange	78
65	Papillomatöser dermaler Nävus. Färbung: Acridine Orange	78
66	Zentraler Ausschnitt aus den melanozytären Nestern eines papillomatösen dermalen Nävus. Färbung: Acridine Orange	79
67	Melanozytäre Nester eines papillomatösen dermalen Nävus. Färbung: Acridine Orange	79
68	Melanozytäre Nester eines Nävus Spitz. Färbung: Acridine Orange	80
69	Übersichtsaufnahme eines dysplastischen Nävus. Färbung: Acridine Orange	81
70	Brückenbildung eines dysplastischen Nävus. Färbung: Acridine Orange	81
71	Übersichtsaufnahme einer asymmetrischen Läsion eines dysplastischen Nävus des Compoundtyps. Färbung: Acridine Orange	82
72	DEJ und dermale melanozytäre Nester eines dysplastischen Nävus. Färbung: Acridine Orange	82
73	Übersichtsaufnahme einer hypertrophen AK. Färbung: Acridine Orange	83
74	Epidermis einer AK. Färbung: Acridine Orange	84
75	Ausschnitt einer bowenoiden AK. Färbung: Acridine Orange	84
76	Wechsel zwischen Hyperorthokeratose und Hyperparakeratose einer AK (a+b) und ein vergrößerter Ausschnitt des <i>Stratum corneum</i> (c+d). Färbung: Acridine Orange	85
77	Hyperparakeratose einer AK. Färbung: Acridine Orange	86
78	Ausschnitt einer AK mit ungeordneter Basalzellschicht. Färbung: Acridine Orange	86
79	Epidermis eines M. Bowen. Färbung: Acridine Orange	87
80	Epidermis und DEJ eines M. Bowen. Färbung: Acridine Orange	87
81	Übersichtsaufnahme eines M. Bowen. Färbung: Acridine Orange	88
82	Übersichtsaufnahme eines oberflächlichen BZK. Färbung: Acridine Orange	89
83	Übersichtsaufnahme eines nodulären BZK. Färbung: Acridine Orange	89
84	Übersichtsaufnahme eines nodulären BZK mit Spaltbildung. Färbung: Acridine Orange	90
85	Epidermis und Dermis eines nodulären BZK. Färbung: Acridine Orange	90

86	Übersichtsaufnahme eines asymmetrischen, nodulären BZK. Färbung: Acridine Orange	91
87	Tumorinseln eines nodulären BZK im RM. Färbung: Acridine Orange	91
88	Ulzeriertes noduläres BZK. Färbung: Acridine Orange	92
89	Tumorinsel eines BZK und gewöhnliche Talgdrüse. Färbung: Acridine Orange	92
90	Mikronoduläres BZK. Färbung: Acridine Orange	93
91	Tumorinseln eines mikronodulären BZK. Färbung: Acridine Orange	93
92	Sklerodermiformes BZK. Färbung: Acridine Orange	94
93	Tumorgewebe eines sklerodermiformen BZK. Färbung: Acridine Orange	94
94	Zystisches BZK. Färbung: Acridine Orange	95
95	Übersichtsaufnahme eines PEK der Haut. Färbung: Acridine Orange	96
96	Epidermis eines PEK der Haut. Färbung: Acridine Orange	97
97	Schlecht differenziertes PEK der Haut. Färbung: Acridine Orange	97
98	Initiales PEK der Haut. Färbung: Acridine Orange	98
99	Tumorzellen eines PEK der Haut. Färbung: Acridine Orange	98
100	Hornperlen eines PEK der Haut im RM. Färbung: Acridine Orange	99
101	Hornperle eines PEK der Haut. Färbung: Acridine Orange	100
102	Entstehung einer Hornperle. Färbung: Acridine Orange	100
103	Metastase eines PEK der Haut. Färbung: Acridine Orange	101
104	Übersichtsaufnahme eines Bowen-Karzinoms. Färbung: Acridine Orange	101
105	Epidermis eines Bowen-Karzinoms. Färbung: Acridine Orange	102
106	Tumorinsel eines Bowen-Karzinoms. Färbung: Acridine Orange	102
107	Keratoakanthom. Färbung: Acridine Orange	103
108	Hornperlen eines Keratoakanthoms. Färbung: Acridine Orange	103
109	Aggregate aus Keratinozyten eines Keratoakanthoms. Färbung: Acridine Orange	104
110	Epidermis und Dermis eines MM. Färbung: Acridine Orange	105
111	Epidermis und Dermis eines MM mit „Consumption“-Phänomen. Färbung: Acridine Orange	106
112	Epidermis und obere Dermis eines SSM. Färbung: Acridine Orange	106
113	DEJ eines SSM. Färbung: Acridine Orange	107
114	Melanozyten eines SSM. Färbung: Acridine Orange	107
115	Epidermis und Dermis eines nodulären MM. Färbung: Acridine Orange	108
116	Epidermis eines nodulären MM. Färbung: Acridine Orange	108
117	Vergrößerter Ausschnitt eines nodulären MM. Färbung: Acridine Orange	109
118	Spitzoides malignes Melanom. Färbung: Acridine Orange	109
119	Epidermis und Dermis eines spitzoiden MM. Färbung: Acridine Orange	110
120	Melanozyten eines spitzoiden MM im. Färbung: Acridine Orange	110
121	Übersichtsaufnahme einer Hautmetastase eines MM. Färbung: Acridine Orange	111
122	Tumorgewebe einer Hautmetastase des MM. Färbung: Acridine Orange	112

Tabellenverzeichnis

1	Anzahl der verschiedenen Präparate der gutartigen nicht-melanozytären Läsionen	38
2	Anzahl verschiedener Subtypen der Nävi	39
3	Anzahl der verschiedenen Subtypen	40
4	Gegenüberstellung der Eigenschaften der gesunden Haut in der ex-vivo KLM und in der Histologie (HE-Färbung)	53
5	Ursachen und Lösungsmöglichkeiten für das Auftreten von Artefakten, sowie die Häufigkeit ihres Vorkommens in Zahlen und Prozent.	60

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Aktinische Keratose
BMP	Bitmap
BZK	Basalzellkarzinom
CT	Computertomografie
DEJ	Dermoepidermale Junktionszone
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FAMMM	Familial atypical multiple mole melanoma syndrome
FM	Fluoreszenz-Modus
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HIV	human immunodeficiency virus
HPV	Humaner Papilloma Virus
ID	Identifikator
KLM	Konfokale Laserscanmikroskopie
KMN	Kongenitale melanozytäre Nävi
M.	Musculus
M. Bowen	Morbus Bowen
MB	Megabyte
Mio.	Millionen
MKC	Mikrografisch kontrollierte Chirurgie
NaCl	Natriumchlorid
NZN	Nävuszellnävus
OCT	Optische Kohärenz-Tomographie
PEK	Plattenepithelkarzinom
PET-CT	Protonenemissionstomografie-Computertomografie
RGB-Wert	Rot-Grün-Blau-Wert
RM	Reflexions-Modus
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
TB	Terabyte
UICC	Union internationale contre le cancer
USA	United States of America
UV	Ultraviolette Strahlung
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Problemstellung der Arbeit

In Deutschland erkranken jährlich ca. 20.000 Personen an einem malignen Melanom (MM), dem sogenannten schwarzen Hautkrebs. Vom nicht-melanozytären oder weißem Hautkrebs werden derzeit jährlich ca. 130.000 Neuerkrankungen registriert [GEKID e.V., 2014]. Experten vermuten, dass die Inzidenz, die in den letzten Jahren stark gestiegen ist, auch in den folgenden Jahren weiter zunehmen wird. Diesem Phänomen liegen verschiedene Ursachen zu Grunde. Einerseits hat sich die UV-Belastung der Bevölkerung durch veränderte Freizeitaktivitäten erhöht, andererseits muss auch der demografische Wandel mit einer Überalterung der Gesellschaft berücksichtigt werden. Auch wächst die Anzahl der Patienten, die regelmäßig die Möglichkeit der Vorsorgeuntersuchungen wahrnehmen.

In der Diagnostik stehen viele Untersuchungsmethoden zur Verfügung, die es bereits präoperativ ermöglichen eine aussagekräftige Verdachtsdiagnose zu stellen. Eine sichere Diagnose kann jedoch nur mit Hilfe der konventionellen histologischen Untersuchung gestellt werden, die den derzeitigen Goldstandard in der Diagnostik darstellt. Deshalb ist es obligat, jede exzidierte Läsion histologisch aufzuarbeiten. Dies birgt jedoch einige Nachteile. Der Zeitaufwand beträgt mehrere Stunden, manchmal sogar Tage, da das Gewebe vor der Untersuchung zuerst fixiert, geschnitten und gefärbt werden muss. Zusätzlich entstehen hohe Kosten im Bereich der Anschaffung und Wartung technischer Geräte, sowie im Personalbereich. Zeigt die histologische Untersuchung, dass eine weitere Operation notwendig ist, kann diese frühestens am Folgetag stattfinden. Dies verursacht wiederum Kosten und stellt für den Patienten eine erhöhte Belastung dar.

Mit der ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskopie (KLM) wurde eine neue Möglichkeit der postoperativen Untersuchung von Gewebe geschaffen, bei der sowohl der Zeitaufwand als auch die Kosten reduziert werden können. Diese Methode ermöglicht das native Gewebe nach einem einfachen Färbevorgang direkt am konfokalen Laserscanmikroskop zu untersuchen. Der Zeitaufwand beträgt hier inklusive Begutachtung, je nach Präparatgröße, nur ca. 10 bis 15 Minuten. So können eventuelle weitere erforderliche Eingriffe direkt erfolgen, ohne dass der Patient den Operationssaal verlassen muss und eine erneute Lokalanästhesie notwendig ist. Dies hat sowohl Vorteile für den Patienten, als auch für die medizinischen Einrichtungen und für das Gesundheitssystem. Der Patient erhält eine gesicherte Diagnose binnen kürzester Zeit. Für die Kliniken ist ein effizienteres Arbeiten mit Kosten- und Zeitreduzierungen möglich. Die in der ex-vivo KLM generierten Bilder werden in Graustufen dargestellt und unterscheiden sich so von der konventionellen Histologie. Wie präzise die Diagnosestellung mit der ex-vivo KLM ist, konnte bisher noch

nicht ausreichend belegt werden.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist zu prüfen, ob die Aufnahmen des ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskops geeignet sind um eine präzise Diagnose stellen zu können und die ex-vivo KLM somit eine effiziente Alternative zur konventionellen Histologie darstellt. Hierfür werden sowohl Präparate gesunder Haut als auch gutartiger und bösartiger, frisch exzidierter Hautveränderungen mittels der ex-vivo KLM untersucht. In den konfokalen Bildern sollen Eigenschaften und morphologische Merkmale erläutert und beschrieben werden, welche die konventionelle Histologie zur Diagnosestellung nutzt. Ebenso werden eventuelle Unterschiede und Abweichungen herausgearbeitet. Da das konfokale Laserscanmikroskop die Bilder in zwei verschiedenen von der Wellenlänge des Lasers abhängigen Modi, dem Reflexions-Modus (RM) und dem Fluoreszenz-Modus (FM), darstellen kann, werden die Bilder in beiden Modi gezeigt, beurteilt und miteinander verglichen.

1.3 Aufbau der Arbeit

Aus der oben beschriebenen Zielsetzung heraus wurde die Arbeit in fünf Abschnitte gegliedert: In Kapitel zwei findet eine Einführung in die Thematik statt. So werden zunächst der Aufbau und die morphologischen Kriterien der gesunden Haut erläutert und anschließend Grundlagen zur Epidemiologie, Ätiologie, Diagnostik, Therapie, zu klinischen Erscheinungsbildern und histologischen Merkmalen verschiedener gutartiger und bösartiger Läsionen erklärt.

Die Funktionsweise eines konfokalen Mikroskops wird im dritten Kapitel dieser Arbeit beschrieben.

Im vierten Kapitel folgt eine Beschreibung des Ablaufs der Studie und der verwendeten Materialien und Methoden, die zur Vorbereitung der Präparate und Untersuchung des Gewebes notwendig waren. Außerdem werden die technischen Daten des verwendeten ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskops erörtert.

Die Ergebnisse werden im fünften Kapitel beschrieben. Zuerst erfolgt eine explorative statistische Auswertung der Patientendaten. Im Anschluss werden die Aufnahmen des Mikroskops gezeigt und erläutert. Dies geschieht getrennt für die einzelnen Läsionen, die im Grundlagenteil erklärt wurden.

Im sechsten Kapitel dieser Arbeit werden Limitationen, Verbesserungsmöglichkeiten und Zukunftsideen diskutiert. Außerdem erfolgt ein Vergleich der ex-vivo KLM mit anderen Untersuchungsmethoden, wie der in-vivo KLM und der Dermatoskopie.

2 Einführung in die Grundlagen der Histologie der gesunden Haut und in die Pathologie verschiedener Hauterkrankungen

2.1 Gesunde Haut

Schichtaufbau der Haut

Die Gesamtfläche der Haut des Menschen beträgt 1,5 bis 2,0m² und hat ein Gewicht von 3,5 bis 10,0kg. Ihre Dicke variiert je nach Lokalisation zwischen 1,5 und 4,0mm [Terhorst, 2009]. Die Haut lässt sich, unabhängig von der Lokalisation, in drei Schichten unterteilen. Die oberste Schicht bildet die Epidermis, anschließend folgt die Dermis und in der Tiefe schließt sich die Subkutis an [Augustin et al., 2010]. Die Epidermis stellt ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel dar, dessen Dicke abhängig von der Lokalisation 30 bis 300µm beträgt. Zahlreiche Nervenfasern befinden sich in dieser Schicht. Die Versorgung der Strukturen der Epidermis erfolgt durch die Diffusion aus dermalen Blutgefäßen, somit ist die Epidermis selbst gefäßfrei [Terhorst, 2009].

Histologisch lässt sich die Epidermis in vier Schichten unterteilen. Das *Stratum basale*, bestehend aus den Basalzellen, stellt die zuunterst liegende Schicht dar. Mitosen finden ausschließlich in dieser Schicht statt. Das sich anschließende *Stratum spinosum* ist eine aus mehreren Zellschichten bestehende Schicht. Hier sind die Zellen durch Desmosomen miteinander verknüpft. Die dritte Schicht bildet das *Stratum granulosum* mit den mit Keratohyalin granula gefüllten Körnerzellen. Das *Stratum corneum* stellt mit seinen flachen, kernlosen, mit Tonofilamenten gefüllten Zellen die oberste und letzte Schicht dar. Eine Besonderheit lässt sich an Handfläche und Fußsohle finden. Hier wird die unterste Zellschicht des *Stratum corneum* als eigene Schicht betrachtet und als *Stratum lucidum* bezeichnet [Augustin et al., 2010]. Als terminale epidermale Differenzierung beschreibt man den Prozess der Zellentwicklung, der mit der Mitose im *Stratum basale* beginnt und mit der Abschilferung der kernlosen Zellen im *Stratum corneum* endet. Die Wanderung der Zellen durch die epidermalen Schichten ist gekennzeichnet durch die Formänderung des Zellkörpers, welche sich zu Beginn als kubisch beschreiben lässt und stetig flacher wird [Augustin et al., 2010]. Die Dauer des gesamten Prozesses beträgt bei gesunder Haut 28 Tage [Plewig et al., 2012].

Vier verschiedene Zelltypen bilden den Hauptanteil der Epidermis. Die Keratinozyten

sind mit 90% der am häufigsten vertretene Zelltyp. Die Basalzelle enthält Tonofilamente, die sich während der Zellreifung biochemisch zu Keratin verändern, welches ein wichtiger Bestandteil des *Stratum corneum* ist. Die Keratinozyten sind untereinander durch *Zonulae occludentes* und *tight junctions* verbunden. Zur Zell-Zell-Kommunikation dienen den Keratinozyten sogenannte *gap junctions* [Augustin et al., 2010].

Die Melanozyten befinden sich bevorzugt in der Basalschicht, sowie in der äußeren Wurzelscheide und dem Bulbus des Haarfollikels. Hier lässt sich eine Dichte von 1100-1500 pro mm² nachweisen [Augustin et al., 2010]. Hauptaufgabe der Melanozyten ist die Produktion und Speicherung von Melanin in den Melanosomen [Terhorst, 2009]. Als sekretorisch aktive Zellen transferieren sie das Melanin in die Keratinozyten [Plewig et al., 2012].

Einen weiteren Zelltyp stellen die Langerhans-Zellen dar, die mit einer Dichte von 500 pro mm² suprabasal in der Epidermis, sowie in der äußeren Wurzelscheide des Haarfollikels vorkommen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Helferzellen und ebenso bei der allergischen Typ-IV-Reaktion [Augustin et al., 2010]. Die Dichte der Merkel-Zellen, welche die kleinste der vier Hauptzellgruppen darstellen, variiert je nach Körperregion der Haut sehr stark und ist am höchsten an den Handflächen, Fußsohlen und den Lippen. Ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch weisen verschiedene Studien darauf hin, dass es sich um neuroendokrine Zellen handelt, die sowohl eine sensorische, eine endokrine als auch eine chemosensorische Funktion besitzen [Munde et al., 2013].

Die Grenze zwischen Epidermis und Dermis wird durch die dermoepidermale Junctionszone (DEJ) gebildet. Ihre Funktion wird durch den Aufbau der Basalmembran ermöglicht. Die Basalmembran besteht aus der *Lamina lucida*, *Lamina densa*, Fibrillen, Kollagenfasern und der Matrix. Der Übergangsbereich von der Epidermis in die Dermis ist durch ein zapfenartiges Aussehen gekennzeichnet. Dieses entsteht durch die epidermalen Reteleisten und die dermalen Papillen, die fingerförmig ineinander greifen [Terhorst, 2009].

Die zweite große Schicht der Haut bildet die Dermis, deren Dicke je nach Lokalisation variiert. Die Dermis ist aus Bindegewebe aufgebaut, welches durch den Hauptzelltyp der Dermis, den Fibroblasten, gebildet wird. Hauptaufgabe der Fibroblasten ist die Produktion von Kollagen. In der Dermis befinden sich Histiozyten und Mastzellen, deren Granula mit Histamin, Serotonin und Heparin gefüllt sind. Seltener lassen sich in der Dermis Melanozyten und Langerhans-Zellen finden [Augustin et al., 2010].

Histologisch lässt sich die Dermis in zwei Schichten unterteilen. Die obere Schicht, das *Stratum papillare* besitzt eine Matrix, die von Zellen und Kapillaren dominiert wird. Im breiteren *Stratum reticulare*, das die untere Schicht darstellt, lassen sich straffe, dichte Kollagenfaserbündel und elastische Fasern finden, die zur mechanischen Stabilität beitragen [Terhorst, 2009]. Die Matrix der Dermis ist aufgebaut aus Proteoglykanen, Wasser, Proteinen, Kohlenhydraten, anorganischen Ionen, Histamin und Serotonin. Die Kollagenfasern bilden ein Netzwerk, das parallel zur Hautoberfläche angeordnet ist. Dieses Netzwerk ist aus Typ-I-Kollagen aufgebaut und sorgt für mechanische Stabilität und Dehn-

barkeit. Eine weitere wichtige Rolle kommt den elastischen Fasern zu. Subepidermal bilden sie den Elastikaplexus und in den tieferen Schichten nehmen sie eine gewellte Form an [Augustin et al., 2010].

Hautanhangsgebilde

Aufbau des Haarfollikels

Die Gesamtzahl der Haare des Menschen wird durchschnittlich auf ca. 5 Mio. geschätzt [Terhorst, 2009]. In der menschlichen Haut wird zwischen drei Haartypen unterschieden. Der Embryo besitzt am gesamten Körper lange, dünne Lanugohaare, welche im achten Schwangerschaftsmonat abgestoßen werden. Kurze Zeit nach der Geburt entwickeln sich die Vellushaare [Wolff and Kunte, 1999]. In der Pubertät tritt der dritte Haartyp immer häufiger auf, das Terminalhaar. Terminalhaare lassen sich nur in bestimmten Körperregionen finden, dazu zählen Kapilitium, Axillen, Genitalbereich, Brauen, Wimpern, Bart und in unterschiedlicher Ausprägung auch Stamm und Extremitäten [Augustin et al., 2010].

Der Haarfollikel zählt zu den Hautanhangsgebilden, die ausschließlich in der Felderhaut vorkommen [Augustin et al., 2010]. Eine Unterteilung des Haarfollikels in 3 Kompartimente ist möglich. Das untere Kompartiment enthält den *Bulbus*, der die dermale Papille umgreift. Das mittlere Kompartiment, auch *Isthmus* genannt, besteht aus dem *M. arrector pili*, der Wulstregion und der Talgdrüse. Das *Infundibulum*, welches das obere Kompartiment bildet, beginnt oberhalb der Einmündung der Talgdrüse und endet an der Hautoberfläche. Umgeben wird der Haarfollikel von einer bindegewebigen Wurzelscheide und einer Basalmembran [Wolff and Kunte, 1999].

Der Haarschaft, das Produkt des Haarfollikels, befindet sich im Haarkanal und durchbricht nach kompletter Verhornung als sichtbares Haar die Hautoberfläche [Wolff and Kunte, 1999]. Zentral im Haarschaft befindet sich die *Medulla* aus avitalen polygonalen Zellen, peripher wird das Mark von der verhornten mit Keratinfilamenten gefüllten Wurzelrinde umgeben und als äußerste Schicht folgt die *Kutikula* [Augustin et al., 2010]. Die Kutikula des Haarschafts wird von der inneren und der äußeren Wurzelscheide ummantelt [Wolff and Kunte, 1999]. Die äußere Wurzelscheide bildet einen fließenden Übergang mit der Epidermis. Der *M. arrector pili* setzt über die Wulstregion an der äußeren Wurzelscheide an [Augustin et al., 2010].

Aufbau der Talgdrüse

Die Talgdrüsen der Haut sind holokrine, lobulär aufgebaute Drüsen, die kein Lumen haben und in den Kanal des Haarfollikels münden [Terhorst, 2009]. Als talgige Differenzierung bezeichnet man den Prozess einer Zelle, die nach ihrer Mitose zum Ausführungsgang wandert und deren Zytoplasma immer mehr durch Lipidtröpfchen ersetzt wird. Diese Entwicklung endet mit dem Platzen der Zelle und mit der Freisetzung des Talgs [Augustin et al., 2010]. Der Talg der menschlichen Haut ist ein Gemisch aus Lipiden, Triglyceriden, Wachsestern und Squalen und dient der Einfettung von Hautoberfläche und Haaren [Ter-

horst, 2009].

In der menschlichen Haut lassen sich auch ektope Talgdrüsen finden. Diese nicht an Follikel gebundenen Drüsen sind hauptsächlich in der Mund- und Lippenschleimhaut lokalisiert [Augustin et al., 2010].

Aufbau der ekkrinen Schweißdrüse

Ekkrine Schweißdrüsen, deren Hauptaufgabe in der Thermoregulation besteht, kommen in der menschlichen Haut in einer Größenordnung von ca. 2 Mio. vor. Diese Drüsenart hat keine Beziehung zu Haarfollikeln und lässt sich am ganzen Integument nachweisen, in besonders großer Dichte an Handflächen und Fußsohlen. Morphologisch lassen sich in der tiefen Dermis stark geknäulte Endstücke mit gestreckten dermalen Ausführungsgängen, sowie spiralig gewundenen intraepidermalen Ausführungsgängen erkennen. Im Gegensatz zu den holokrinen Talgdrüsen handelt es sich bei diesen Drüsen um sekretorische Zellen [Augustin et al., 2010]. Schweiß ist eine wässrige Natriumchloridlösung, die das Bakterienwachstum auf der Haut hemmt [Terhorst, 2009].

2.2 Benigne Veränderungen der Haut

2.2.1 Virusassoziierte Hautveränderungen

Verruca vulgaris

Gewöhnliche Warzen werden durch die Typen 1, 2, 4 und 7 der Humanen Papilloma Viren (HPV) hervorgerufen und eine Infektion kann von Mensch zu Mensch oder durch infizierte Gegenstände erfolgen. Das charakteristische klinische Bild zeigt ein hautfarbenes, hartes, wenige Millimeter großes Knötchen, das im späteren Stadium durch die fortschreitende Verhornung eine raue Oberfläche annimmt. Nicht selten befinden sich in der Umgebung Tochterwarzen [Augustin et al., 2010]. Die histologische Untersuchung zeigt eine Hyperplasie der Epidermis mit deutlicher Akanthose sowie Papillomatose mit verlängerten Reteleisten. Eine Hyperkeratose ist außerdem typisch. Im *Stratum granulosum* befinden sich zahlreiche Koilozyten [Megahed, 2012]. Koilozyten sind durch HPV veränderte Keratinozyten, die durch Vakuolisierung um den Zellkern gekennzeichnet sind. Aufgrund dieses Phänomens zeigt sich bei der mikroskopischen Untersuchung ein heller Hof um den Zellkern.

Condyloma acuminata

Diese ebenfalls durch HPV (Typ 6 und 11) verursachten Warzen befinden sich in den intertriginösen Schleimhautregionen, da sie ein warmes, feuchtes Milieu bevorzugen. Sie stellen sich als Papeln von wenigen Millimetern Größe dar, die im Verlauf wachsen und zu blumenkohlartigen Beeten konfluieren können [Augustin et al., 2010]. Wichtige Anzeichen der Histologie sind Hyperkeratose, Akanthose und Papillomatose. Koilozyten sind hier seltener [Megahed, 2012].

Molluscum contagiosum

Hauptsächlich werden *Mollusca contagiosa*, auch Dellwarzen genannt, bei Kindern und Jugendlichen diagnostiziert. Die Warzen gelten als sehr ansteckend und werden von Mensch zu Mensch übertragen. Klinisch imponieren einzelne oder multiple wenige Millimeter große, harte Papeln, die hautfarben sind und meist eine zentrale Delle besitzen. Ein Ausdrücken der Warzen ist möglich, dabei entleert sich eine virenhaltige Masse [Augustin et al., 2010]. Histologisch zeigt sich eine hypertrophe und hyperplastische Epidermis, die sackförmige Einstülpungen enthält, welche mit virusinfizierten Zellen (Molluscum Körperchen) gefüllt sind [Kempf et al., 2007].

2.2.2 Benigne nicht-melanozytäre Hautveränderungen

Verruca seborrhoica

Die seborrhoischen Warzen oder Alterswarzen sind gutartige Tumoren der Haut, die im höheren Lebensalter sehr häufig, meist multipel auftreten und bevorzugt im Gesicht und am Stamm lokalisiert sind. Das klinische Bild ist sehr variabel, aber eine Größe von 1cm wird selten überschritten. Die Tumoren wachsen exophytisch und besitzen eine pigmentierte, matte Oberfläche, die in fortgeschrittenem Stadium zerklüftet erscheint. Die Konsistenz der Läsionen ist weich und fettig. Histologisch ist eine papillomatöse, exophytische Proliferation der basalen Zellen charakteristisch. Die Ausbildung von Hornperlen ist ebenso typisch. Bei der pigmentierten Verruca seborrhoica sind eine Melaninhyperpigmentierung der Epidermis, sowie das Vorhandensein von Makrophagen mit phagozytiertem Melanin auffallend [Plewig et al., 2012].

Cicatrix

Eine Narbe ist das Ergebnis eines Reparaturversuchs des zerstörten Bindegewebes. Als Fibrose wird der Ersatz des verloren gegangenen Bindegewebes durch faserreiches Gewebe bezeichnet. Bei frischen Narben findet sich stets eine Rötung, die mit der Zeit jedoch vollständig verloren geht. Histologisch lässt sich ebenfalls erkennen, ob es sich um eine erst kurz oder schon länger bestehende Narbe handelt. Zu Beginn ist die Epidermis Akanthotisch verbreitert und die dünnen kollagenen Fasern liegen in einem lockeren Geflecht beisammen. Später wird die Epidermis atrophisch und die kollagenen Fasern richten sich parallel zur Hautoberfläche aus. In beiden Stadien ist die Anzahl der Fibroblasten und kapillären Gefäße erhöht [Megahed, 2012].

Akne inversa

Die Akne inversa ist eine chronisch-rezidivierende entzündliche Erkrankung, welche die Achsel- und Leistenregion betrifft. Zunächst findet eine Hyperkeratose der Haarfollikel und der Schweißdrüsen statt. Später kommt es zu einer bakteriellen Superinfektion mit *Staphylococcus aureus*, durch die eine Ausbildung von Abszessen hervorgerufen wird. Klinisch zeigen sich rötliche, schmerzhaftes Knoten die eitrig einschmelzen können oder nar-

big abheilen [Augustin et al., 2010].

Das Lipom

Das Lipom ist ein gutartiger, mesenchymaler Tumor, der von den Fettgewebszellen des subkutanen Fettgewebes ausgeht. Am häufigsten wird dieser Tumor in der Kopf-Hals-Region diagnostiziert [Chronopoulos et al., 2010]. Klinisch handelt es sich um einzeln oder multipel auftretende, prall-elastische Knoten von sehr unterschiedlicher Größe, die zum Teil direkt unter der unveränderten Haut liegen und seltener auch in den tieferen Gewebeschichten [Augustin et al., 2010]. Histologisch ist das Lipom schwer vom physiologisch vorkommenden Fettgewebe zu unterscheiden. Es handelt sich um vollständig ausgereifte Fettzellen die weder im Kern noch im Zytoplasma Atypien zeigen. Die prall mit Fett gefüllten Zellen, deren Kerne an die Zellmembran gedrückt sind, bilden ein gleichmäßiges Muster, das an Bienenwaben erinnert.

Fibroma molle

Fibrome sind gutartige Tumoren des Bindegewebes, die am häufigsten in den Axillen und am Hals auftreten. Klinisch imponieren sie als kleine, hautfarbene, halbkugelige Läsionen mit weicher Konsistenz [Augustin et al., 2010]. Die histologische Untersuchung zeigt eine polypoide Läsion, die ein zellarmes Stroma mit reichlich kollagenen Fasern besitzt [Megahed, 2012].

Neurofibrom

Die dermalen Neurofibrome sind gutartige Tumoren des Nervengewebes mit einem relativ hohen Bindegewebsanteil [Augustin et al., 2010]. Makroskopisch zeigen sich einzelne Tumoren weicher Konsistenz, die keine Kapsel besitzen. Histologisch finden sich Proliferationen von Schwann-Zellen, Fibroblasten und perineuralen Zellen.

2.2.3 Melanozytäre Hautveränderungen

Melanozytäre Nävi

Der Begriff melanozytärer Nävus oder Pigmentnävus beschreibt eine gutartige Proliferation der Melanozyten in der menschlichen Haut, die meist eine bräunliche oder auch rötliche Farbe besitzt. Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob es sich hierbei um Fehlbildungen, Hamartome oder benigne Tumoren handelt [Plewig et al., 2012]. Der meist multipel auftretende melanozytäre Nävus ist die häufigste gutartige Neubildung in der weißen Bevölkerung [Hauschild et al., 2011].

Nävuszellen stellen eine besondere Differenzierungsform der Melanozyten dar. Sie haben ihre dendritische Form, sowie die Fähigkeit der Melaninabgabe verloren [Terhorst, 2009]. Ihre Formen variieren zwischen groß und rundlich sowie klein und spindelig.

Im Durchschnitt besitzt jeder Mensch ca. 20 bis 30 Nävi die sich zum großen Teil bereits im Kindesalter entwickeln. Die Anzahl der Nävi korreliert mit dem Risiko der Entwicklung eines MM, dem schwarzen Hautkrebs. So ist das Risiko an einem MM zu erkranken

bei einer Gesamtanzahl von 100 Nävi um den Faktor 8 bis 10 erhöht. Es wird angenommen, dass ca. ein Drittel aller Melanome auf dem Boden eines Nävus entstehen [Hauschild et al., 2011]. Die Größe der Nävi variiert von wenigen Millimetern bis hin zu mehreren Zentimetern.

Ein NZN durchläuft verschiedene Entwicklungsstadien, die während der Kindheit beginnen und im Erwachsenenalter die Endstufe erreichen. Die Bezeichnung der einzelnen Stadien leitet sich von der jeweiligen Lokalisation der Nävuszellnester ab:

- *Lentigo simplex*: Die *Lentigo simplex* stellt das initiale Entwicklungsstadium dar und imponiert als homogene braune bis braunschwarze Makula. Sie ist scharf begrenzt und überschreitet eine Größe von wenigen Millimetern nicht. Histologisch zeigt sich eine Hyperplasie der basalen Melanozyten, sowie eine deutlich sichtbare Verlängerung der Reteleisten [Hauschild et al., 2011].
- *Nävus vom Junctionstyp*: In diesem Entwicklungsstadium zeigt sich klinisch eine runde Makula mit einer homogenen braunen bis dunkelbraunen Pigmentierung. Die Läsion ist scharf begrenzt und häufig papulös. Die Nester der Nävuszellen sind ausschließlich im Bereich der DEJ, bevorzugt an den Spitzen der Reteleisten lokalisiert. Es kommt zur Ausschleusung von Pigment in das *Stratum corneum* [Plewig et al., 2012].
- *Nävus vom Compoundtyp*: Klinisch imponiert eine runde bis ovale, flache Papel, die häufig eine zerklüftete Oberfläche besitzt. Histologisch zeigen sich Nävuszellnester sowohl in der DEJ, als auch im dermalen Bindegewebe [Augustin et al., 2010].
- *Nävus vom dermalen Typ*: Dieser Typ stellt den Endzustand der Entwicklung dar und erscheint als papulöses Knötchen, welches weniger stark pigmentiert ist. In der histologischen Untersuchung lassen sich Nävuszellnester weder in der Epidermis, noch in der DEJ feststellen, sondern ausschließlich im Bereich der Dermis [Augustin et al., 2010]. Im Erwachsenenalter kommt es häufig zu einer Rückbildung oder einer lipomatösen, beziehungsweise bindegewebigen Umwandlung [Terhorst, 2009].

Diese Entwicklung wird auch als die „Abtropfungstheorie nach Unna“ bezeichnet, da die Nävuszellen von der Epidermis in die tiefere Dermis wandern. Allerdings ist diese Theorie heute umstritten, da diese Entwicklung nicht ausnahmslos stattfindet. So werden zum einen Nävi vom junctionalen Typ bei Menschen in höherem Alter und Nävi vom dermalen Typ auch bereits bei Kindern beobachtet [Plewig et al., 2012]. Für die Entstehung eines melanozytären Nävus sind vier Hauptursachen bekannt. Der bedeutendste Faktor ist die UV-Belastung, insbesondere im Kindesalter. Eine hohe intermittierende UV-Belastung hat die Entwicklung einer höheren Anzahl an Nävi zur Folge. Personen mit hellem Hauttyp 1 oder 2 sind stärker gefährdet. Genetische Ursachen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. Es konnte belegt werden, dass sowohl bei Nävi, als auch bei MM eine Mutation des BRAF-Gens vorliegt [Hauschild et al., 2011].

Des Weiteren scheinen hormonelle Faktoren einen Einfluss auf die Entstehung von Nävi zu haben, da es zum Beispiel in der Pubertät und der Schwangerschaft zur Neuentwicklung kommen kann. Eine Immunsuppression als Folge einer HIV-Erkrankung oder die Einnahme bestimmter Medikamente können ebenfalls die Entstehung von Nävi fördern.

Kongenitale melanozytäre Nävi

Kongenitale melanozytäre Nävi (KMN) tragen ihren Namen, da sie bereits bei der Geburt vorhanden sind oder sich spätestens im Neugeborenenalter manifestieren. Sie treten bei etwa 1% der Neugeborenen auf und verlangen besondere Aufmerksamkeit, da ihr Entartungsrisiko, allerdings in Abhängigkeit der Größe des KMN, mit 5% bis maximal 15% deutlich höher liegt als das der erworbenen Nävi [Hauschild et al., 2011].

Klinisch zeigt sich eine Makula oder Papel, die scharf begrenzt und homogen pigmentiert ist. Die Größe der Läsionen kann je nach Subtyp auch größere Hautareale betreffen. Häufig fällt eine starke Behaarung der KMN auf.

Histologisch werden in einem KMN Melanozyten nachgewiesen, die sich in Form von Nestern und Strängen sogar in den tiefen Schichten der Dermis ansiedeln [LeBoit, 2006].

Dysplastische oder atypische Nävi

Bei dieser Form der Nävi ist nicht exakt definiert ob sie als atypisch oder dysplastisch bezeichnet werden sollen. Meist wird der Begriff „atypisch“ auf das klinische Erscheinungsbild bezogen und der Begriff „dysplastisch“ auf die histologischen Befunde. Die Diagnose wird klinisch und histologisch individuell getroffen und stimmt häufig nicht überein [Hauschild et al., 2011].

Die Wahrscheinlichkeit der malignen Entartung ist mit einem Risiko von 1:3000 bei dysplastischen Nävi signifikant erhöht [LeBoit, 2006]. Entscheidend ist die Anzahl der dysplastischen Nävi, mit deren Zunahme das Risiko für ein MM steigt.

Dysplastische Nävi können einzeln aber auch in großer Anzahl auftreten. Bei Vorhandensein auffallend vieler Läsionen muss eine genetische Ursache im Rahmen des „FAMMM-Syndroms“ (Familial atypical multiple mole melanoma syndrome) in Betracht gezogen werden [Hauschild et al., 2011].

Klinisch bereitet es häufig Schwierigkeiten atypische Nävi sicher zu diagnostizieren. Eine holländische Arbeitsgruppe hat fünf Kriterien festgelegt, welche als diagnostische Hilfe dienen sollen. Dazu zählen eine Größe ab 5mm, unscharfe Begrenzung, Asymmetrie, unregelmäßige Pigmentierung, sowie das Vorhandensein eines roten Hofs [LeBoit, 2006]. Diese Kriterien überschneiden sich deutlich mit der „ABCD-Regel“, die zur Erkennung maligner Melanome dient. Atypische Nävi sind hauptsächlich am Stamm, sowie an den oberen Extremitäten lokalisiert.

Da die klinische Untersuchung keine ausreichende Diagnosesicherheit liefern kann, werden suspekt Läsionen histologisch aufgearbeitet. Die Dysplasie wird hier anhand bestimmter Hauptkriterien belegt. Die Melanozyten besitzen hyperchromatische, atypische Kerne und sind unregelmäßig verteilt. In der Dermis zeigt sich eine Fibroplasie, erweiterte Kapillaren, sowie ein perivaskuläres Entzündungsinfiltrat [Plewig et al., 2012].

Melanomsimulatoren

Als Melanomsimulatoren werden gutartige Neubildungen der Haut bezeichnet, die klinisch oder auch histologisch mit einem MM verwechselt werden können. Zu dieser Gruppe zählen die Spitz-Nävi, akrale melanozytäre Nävi, Nävi des Genital- oder Milchleistenbereichs, sowie Rezidiv-Nävi.

Spitz-Nävi sind meist erworben, treten größten Teils bereits im Kindesalter auf und sind bevorzugt im Gesicht lokalisiert. Charakteristisch ist ein rasches Wachstum, sowie die Gestalt eines einzelnen Knötchens mit glatter Oberfläche das hellrot bis braun erscheint. Histologisch zeigt sich ein seitlich scharf begrenzter, symmetrischer Tumor mit spindelförmigen und epitheloiden Zellen mit großen Zellkernen. Die Spindelzellen sind bündelförmig, senkrecht zur Epidermis angeordnet und in den dermalen Papillen lokalisiert. Die epitheloiden Zellen besitzen eine polygonale Form, reichlich eosinophiles Zytoplasma und liegen verstreut im gesamten Tumorbezirk. Häufig besitzen sie ein leicht atypisches Aussehen, sind aber stets gutartig. Diagnostisch beweisend sind sogenannte „Kaminobodies“, bei denen es sich um große eosinophile Granula handelt, welche entlang der DEJ angeordnet sind [Hauschild et al., 2011].

Rezidiv-Nävi treten ca. sechs Monate nach inkompletter Entfernung eines Nävus auf. Vor allem nach oberflächlicher Shave Behandlung, Dermabrasion oder Laserbehandlung können diese Läsionen entstehen [LeBoit, 2006]. Sie erscheinen als flache, asymmetrische und unregelmäßig begrenzte Läsionen mit einer braunen bis schwarzen Pigmentierung. Charakteristisch ist die sichtbare Narbe, die durch den vorangegangenen chirurgischen Eingriff entstanden ist. Diese Läsionen sind histologisch schwer zu beurteilen. Intraepidermale Melanozytenproliferationen, welche die Narbe jedoch nicht überschreiten, dominieren das Bild. Um eine fundierte Diagnose stellen zu können, müssen die histologischen Schnitte des ersten Eingriffs herangezogen werden [Hauschild et al., 2011].

Diagnostik

Die Diagnostik dient vor allem zur Klärung zweier Punkte. Zum Einen soll eine Subtypisierung des Nävus stattfinden und zum Anderen soll eine Abgrenzung zum MM erfolgen. Die „ABCD-Regel“ gilt als der Goldstandard der klinischen Untersuchung. Asymmetrie, Begrenzung, Colorit und Durchmesser werden beurteilt. Sind diese Kriterien auffällig, liegt der Verdacht auf einen dysplastischen Nävus oder MM vor.

Eine weitere immer häufiger angewandte Methode ist die „Regel des hässlichen Entleins“. Diese besagt, dass jene Nävi atypisch sind die sich von dem patientenspezifischen Nävus-Bild deutlich unterscheiden [Hauschild et al., 2011].

Die Dermatoskopie bietet heute eine sehr zuverlässige diagnostische Hilfe. Sie dient zur Unterscheidung von benignen und malignen Läsionen. Als Beurteilungshilfe stehen hier verschiedene Scores und Algorithmen zur Verfügung [Hauschild et al., 2011].

Die computergestützte Dermatoskopie findet vor allem Anwendung bei Patienten die sehr viele oder auch atypische Nävi besitzen. Durch den Vergleich der chronologisch aufgenommenen Bilder ist eine Verlaufsbeobachtung möglich und Veränderungen können

schneller erkannt werden [Hauschild et al., 2011]. Ein relativ neues Verfahren zur Beurteilung von Nävi ist die in-vivo KLM. Durch die Beurteilung einer Läsion mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops, welches direkt auf die Haut aufgelegt wird, kann eine Diagnose innerhalb kurzer Zeit gestellt werden. Die diagnostische Genauigkeit dieser Methode ist sehr hoch.

Therapie und Prävention

Eine Indikation für eine Therapie besteht grundsätzlich für Läsionen bei welchen ein Verdacht auf ein MM vorliegt, um diesen histologisch zu bestätigen oder auszuschließen, sowie bei Läsionen für die ein erhöhtes Risiko besteht sich in ein MM zu transformieren. Einige Patienten wünschen eine Entfernung bestimmter Läsionen auch aus kosmetischen Gründen. Am häufigsten müssen dysplastische und kongenitale Nävi entfernt werden, da bei diesen Typen das Entartungsrisiko signifikant erhöht ist [Hauschild et al., 2011].

Da bei suspekten Läsionen eine histologische Abgrenzung zum MM zwingend erforderlich ist, darf es bei der Entfernung der Läsionen zur keiner Zerstörung oder Schädigung des Gewebes kommen. Kontraindiziert sind deshalb Verfahren wie die Laserablation, die Kryotherapie oder die photodynamische Therapie. Goldstandard für die Entfernung von Nävi ist die chirurgische Exzision im Gesunden mit anschließender histologischer Aufarbeitung [Hauschild et al., 2011].

Halbjährliche oder jährliche Früherkennungsuntersuchungen werden vor allem für Risikopatienten empfohlen. Dazu zählen Patienten mit einer Anzahl von 100 Nävi oder mehr, mit großen KMN, mit familiärem Melanom, mit einer Melanomdiagnose in der Vorgeschichte und Patienten die am „FAMMM-Syndrom“ leiden. Die Untersuchungen finden mit Hilfe der Auflichtmikroskopie (Dermatoskopie) oder der computergestützten Dermatoskopie statt. Seit 2008 wird ein Hautkrebsscreening, das zur Früherkennung dient, von den gesetzlichen Krankenkassen empfohlen und übernommen [Hauschild et al., 2011].

Die Entstehung von Nävi kann vermieden oder in der Anzahl verringert werden, wenn bestimmte präventive Maßnahmen befolgt werden. An erster Stelle steht die Vermeidung von Sonnenbränden, besonders in der Kindheit. Folgende Schutzmaßnahmen sind unter anderem von Bedeutung: UV-Abstinenz in der Mittagssonne, die korrekte Anwendung von Lichtschutzmitteln, sowie das Tragen einer adäquaten Kleidung zur Abschirmung der UV-Strahlung [Hauschild et al., 2011].

2.3 Präkanzerosen

2.3.1 Aktnische Keratose

Die aktinische Keratose (AK) ist ein *Carcinoma in situ* das sehr langsam wächst, aber nach Jahren in ein invasives Plattenepithelkarzinom übergehen kann. Eine maligne Transformation, die durch das Durchbrechen der atypischen Zellen durch die Basalmembran in die Dermis definiert ist, findet bei ca. 10% aller AK statt [Glogau, 2000].

Als Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer AK wird die kumulative UV-Belastung gesehen. Betroffen sind vor allem hellhäutige Menschen mit Hauttyp I oder II. Männer erkranken häufiger als Frauen. Die Inzidenz in Europa nimmt aufgrund erhöhter freizeit- und auch berufsbedingter Sonnenexposition stetig zu. Ebenso steigt die Anzahl von Reisen in entsprechende geographische Breiten. [Plewig et al., 2012]. Auch schwere Sonnenbrände scheinen das Risiko an einer AK zu erkranken signifikant zu erhöhen [Stockfleth et al., 2012].

AK entwickeln sich meist auf degenerativ veränderten und chronisch-lichtexponierten Hautarealen mit einer Latenzzeit von 10 bis 20 Jahren. Durch die UVB-Strahlung kommt es zu einer direkten Schädigung der DNS, wodurch eine Entwicklung von atypischen Keratinozyten hervorgerufen wird [Plewig et al., 2012].

Klinik und Diagnostik

Klinisch zeigen sich scharf begrenzte, schuppige Herde die in ihrer Größe stark variieren. Sie können sowohl einzeln als auch multipel auftreten und sind bevorzugt im Gesicht, an den Unterarmen oder auf dem Handrücken lokalisiert [Augustin et al., 2010]. Es wird zwischen vier klinischen Typen differenziert. Am häufigsten treten der erythematöse und der hyperkeratotische Typ auf. Seltener wird eine pigmentierte AK oder eine AK vom Cornu-cutaneum-Typ diagnostiziert [Plewig et al., 2012]. Zu den Anzeichen einer malignen Transformation in ein Plattenepithelkarzinom, die im Durchschnitt zwei Jahre nach der Neuentstehung einer AK stattfindet, zählen Verhärtung, Blutung, Größenzunahme, sowie Ulzeration [Stockfleth et al., 2012].

In der Regel kann bereits klinisch durch Inspektion oder besser Palpation, eine korrekte Verdachtsdiagnose gestellt werden. Eine Hilfestellung können die Dermatoskopie, sowie auch die in-vivo KLM bieten [Stockfleth et al., 2012].

Histologie

Bestätigt werden kann die Verdachtsdiagnose jedoch nur durch eine histologische Untersuchung. Es sind drei histologische Merkmale bekannt, die zur sicheren Diagnose der AK führen. Dazu zählt das Auftreten von atypischen Keratinozyten, die in den unteren Schichten der Epidermis lokalisiert sind und nicht mehr fähig sind Keratohyalin granula zu bilden. In den Bereichen der oberen Schichten der Epidermis, die über diesen atypischen Keratinozyten lokalisiert sind, lässt sich eine Parakeratose feststellen. Außerdem zeigt die Dermis meist eine solare Elastose. Wegweisend ist ebenfalls das „Flaggenzeichen“, das eine abwechselnde Parakeratose und Orthokeratose beschreibt [Megahed, 2012].

Insgesamt lässt sich histologisch zwischen sechs Sonderformen der AK differenzieren. Dazu zählen die hypertrophe, atrophe, akantholytische, bowenoide, lichenoiden und pigmentierte AK [LeBoit, 2006]. Die hypertrophe AK zeigt eine Akanthose, während die atrophe AK eine atrophische Epidermis besitzt. Bei der akantholytischen AK ist eine suprabasale Akantholyse festzustellen. Die lichenoiden AK besitzt im Korium ein entzündliches Infiltrat und bei der bowenoiden AK sind die atypischen Keratinozyten in allen Schichten der Epidermis lokalisiert [Megahed, 2012]. Interessant ist, dass die Veränderungen der

Epidermis bei der AK und dem Plattenepithelkarzinom der Haut identisch sind. Der Unterschied zeigt sich lediglich in der Basalzellschicht, die bei der AK intakt und beim PEK durchbrochen ist [Ackerman and Mones, 2006].

Therapie und Prävention

Da die Möglichkeit einer malignen Transformation besteht, ist das Vorhandensein einer AK stets eine Indikation für eine Therapie. Bei der Wahl der Therapiemethode werden sowohl Verlauf, Lokalisation und Ausdehnung, als auch Alter, Gesundheitszustand und Compliance des Patienten berücksichtigt [Stockfleth et al., 2012]. Zu den Standardverfahren zählen die oberflächliche operative Entfernung, wie zum Beispiel die tangential-flache Flachabtragung und Kürettage. Alternativ können auch die Kryotherapie oder Lasertherapie angewendet werden. Zu den geeigneten Lokaltherapeutika zählen 5-Fluoruracil, Imiquimod und Diclofenac [Stockfleth et al., 2012]. Die photodynamische Therapie wird besonders bei großflächigen Läsionen angewendet [Plewig et al., 2012].

Um der Entstehung von AK vorzubeugen wird das Vermeiden starker UV-Belastungen empfohlen. Auf der einen Seite stellt die regelmäßige Anwendung von Lichtschutzmitteln eine Präventionsmaßnahme dar und auf der anderen Seite kann sie sogar eine Rückbildung der bereits bestehenden AK fördern [Thompson et al., 1993].

2.3.2 Morbus Bowen

Der Begriff Morbus Bowen (M.Bowen) steht für ein intraepidermales *Carcinoma in situ*, benannt nach John T. Bowen [Bowen, 1983]. Es ist gekennzeichnet durch ein langsames Wachstum, sowie sein klinisches Erscheinungsbild, welches in vielen Fällen an eine Psoriasis-Plaques oder ein nummuläres Ekzem erinnert. In 30% bis 50% der Fälle kommt es zur malignen Transformation in ein Bowen-Karzinom. Diese Form entspricht dem invasiven Plattenepithelkarzinom der Haut [Augustin et al., 2010].

Betroffen sind vor allem hellhäutige Personen, mit Hauttyp I oder II, ab dem 40. Lebensjahr mit einem Häufigkeitsgipfel in der sechsten bis achten Lebensdekade. Männer sind sehr viel häufiger betroffen als Frauen, die mit nur 20% einen relativ kleinen Anteil an der Gesamtzahl der Erkrankten einnehmen [LeBoit, 2006]. Die genauen Ursachen für die Entstehung eines M. Bowen sind bisher nicht vollständig geklärt, jedoch wird angenommen, dass multiple Faktoren beteiligt sind. Zu den Hauptkriterien zählen UVB-Strahlung, chronische Arsenzufuhr, sowie HPV Typ 16 und 18. Nebensächlich scheinen Störungen des Immunsystems, Traumata, chronische Irritationen, mutagene Stoffe, sowie Tabak eine Rolle zu spielen [LeBoit, 2006].

Klinik

Die Tumoren können prinzipiell an jeder beliebigen Lokalisation der Haut auftreten, werden jedoch am häufigsten am Gesicht, Nacken, Rumpf, Unterschenkel und an den Fingern diagnostiziert. Bei 60% der Patienten handelt es sich um Einzelherde und bei 40% der Patienten treten multiple Läsionen auf [Plewig et al., 2012]. Die Herde imponieren als

erythematöse, leicht erhabene, weißgraue oder weißgelbe schuppende Plaques mit einer Größe die von wenigen Millimetern bis zu einigen Zentimetern reicht. Histologisch sind Hyperkeratosen und Parakeratosen charakteristisch, sowie eine akanthotisch verbreiterte Epidermis mit atypischen Epithelzellen in allen Epidermislagen. Die typische Struktur der Dermis wird durch ein chronisch-entzündliches Infiltrat unterbrochen. Die DEJ ist an allen Stellen intakt [LeBoit, 2006].

Therapie

Therapie erster Wahl stellt die chirurgische Exzision mit anschließender histopathologischer Aufarbeitung dar. Alternativ kann eine Laserbehandlung, eine Kürettage mit anschließender Elektrodesikkation oder eine Kryotherapie erfolgen [Plewig et al., 2012]. Bei großflächigen Läsionen kann eine medikamentöse Anwendung von topischem 5-Fluoruracil oder Imiquimod 5% erfolgen. Außerdem kann eine photodynamische Therapie oder Röntgenweichstrahlentherapie erfolgreich sein [Plewig et al., 2012].

2.4 Semimaligner Tumor – Basalzellkarzinom

Mit einer Inzidenz von 100 Neuerkrankungen pro Jahr bezogen auf 100.000 Einwohner ist das Basalzellkarzinom (BZK) einer der am häufigsten auftretenden Tumoren in Deutschland [Augustin et al., 2010]. In Europa, Australien und den USA ist das BZK das am häufigsten diagnostizierte Karzinom [Telfer et al., 2008]. Die Inzidenz steigt jährlich um ca. 3% bis 8% [Plewig et al., 2012] und hat sich innerhalb der letzten 20 Jahre verdoppelt [Terhorst, 2009]. Der Häufigkeitsgipfel der Neuerkrankungen liegt zwischen dem sechsten und achten Lebensjahrzehnt [Plewig et al., 2012]. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen. Entscheidend für die Einschätzung des Risikos an einem BZK zu erkranken ist die geographische Lage in welcher der Mensch lebt. So ist das Risiko in Australien 20-fach höher als in Europa [Plewig et al., 2012].

Das BZK ist ein Tumor der behaarten Haut, der langsam, aber lokal destruierend wächst. Durch sein infiltratives Wachstum kann er angrenzende Gewebestrukturen zerstören. Nur in sehr wenigen Ausnahmefällen kann eine lymphogene oder hämatogene Streuung eintreten [Moser et al., 2014]. Deshalb wird dieser Tumor als semimaligne bezeichnet.

Heute ist eine Reihe von Risikofaktoren für die Entstehung von Basalzellkarzinomen bekannt. Einer der wichtigsten Faktoren stellt die kumulative UVB-Dosis dar, der ein Mensch während seines Lebens ausgesetzt ist. Je höher diese Dosis an UVB-Strahlung ist, desto größer ist die Gefahr der Induktion von DNS-Schäden. Das erklärt, warum der Tumor bevorzugt an sonnenexponierten Stellen und bei Menschen mit Hauttyp I oder II auftritt. Untersuchungen haben ergeben, dass besonders die UV-Belastung im Kindesalter von großer Bedeutung ist [Telfer et al., 2008]. Aktuell wird diskutiert, ob das BZK als Berufskrankheit anerkannt werden soll, bei Berufen welche zum großen Teil im Freien ausgeübt werden [Fartasch et al., 2012]. Des Weiteren spielt die Genetik eine entscheidende

Rolle, was sich an dem durch die Mutation des PTCH1-Gens ausgelösten „Gorlin-Goltz-Syndroms“ zeigen lässt. Diese Krankheit wird autosomal dominant vererbt [LeBoit, 2006]. Zu den weiteren Risikofaktoren zählen medikamentös bedingte Immunsuppression, ionisierende Strahlen, Karzinogene wie Arsen und chronische Hautschädigungen wie Narben und Druckstellen [Plewig et al., 2012].

Das BZK besteht aus Zellen, welche morphologisch an die Zellen des *Stratum basale* und des Haarfollikels erinnern. Der histogenetische Ursprung ist noch nicht vollständig geklärt [Sellheyer, 2011]. Es wird angenommen, dass das BZK seinen Ursprung in den undifferenzierten, pluripotenten epithelialen Stammzellen hat. Diese Zellen stammen von interfollikulären Basalzellen, von den Stammzellen des Haarfollikels oder von Talgdrüsen [Sellheyer, 2011]. 80% aller BZK sind im Kopf-Hals-Bereich lokalisiert [Megahed, 2012]. Mit 30% ist die Nase die am häufigsten betroffene Körperstelle [Plewig et al., 2012]. BZK gehören zum hellen, nicht-melanozytären Hautkrebs und entstehen auf zuvor gesunder Haut ohne Vorstufen.

Klinik und Histologie

Klinisch und histologisch können verschiedene Formen festgestellt werden. Allen Formen gemeinsam sind die Tumorzellproliferationen, welche in Nestern, Strängen oder schmalen Bändern angeordnet sind und nur ein sehr schmales Zytoplasma enthalten. Umgeben sind diese Nester von dermalem Stroma. Charakteristisch ist die palisadenartige Stellung der Zellen der äußeren Schicht des Tumors. Spaltbildungen zwischen Tumor und umgebendem Stroma sind typisch [LeBoit, 2006]. Zu den häufigsten Formen des BZK zählen:

- *Noduläres BZK*: Diese Form wird auch als solides BZK bezeichnet und bildet mit 60 bis 80% den Hauptanteil aller BZK [LeBoit, 2006]. Klinisch lässt sich ein erhabenes, perlmuttartig schimmerndes Knötchen erkennen, das der Haut breitbasig aufsitzt und scharf begrenzt ist. Charakteristisch sind der perlschnurartig aufgeworfene Randsaum und die starke Gefäßzeichnung. Häufig sind auch Ulzerationen oder die Bildung von Krusten zu beobachten. Histologisch zeigen sich große Nester von Basalzellen mit peripherer Palisadenstellung die bis ins Stratum reticulare oder tiefer reichen.
- *Mikronoduläres BZK*: Das mikronoduläre BKZ stellt sich als erhabener oder flacher infiltrativer Tumor dar. Bei der histologischen Untersuchung lassen sich kleine, nah beieinander liegende Knötchen erkennen, welche die Dermis durchdringen.
- *Pigmentiertes BZK*: Bei diesem Subtyp ist die Pigmentierung der Tumorzellen verstärkt. Außerdem befinden sich im Korium Melanophagen [Megahed, 2012].
- *Zystisches BZK*: Klinisch imponiert der Tumor durch seine weiß-bläuliche, fast glasartige Erscheinung. Histologisch fallen zystische Räume zwischen den Tumorzellproliferationen auf.

- *Superfiziell-multizentrisches BZK*: Multiple rötliche erythematöse Makulä die scharf aber unregelmäßig begrenzt sind stellen das Hauptkennzeichen dieses Subtyps dar. Im histologischen Schnitt dominieren die oberflächlichen, epidermisnahen Nester aus basaloiden Zellen, die im *Stratum papillare* lokalisiert sind [Megahed, 2012].
- *Sklerodermiformes BZK*: Besondere Sorgfältigkeit in der Diagnostik ist bei dieser Tumormform entscheidend, da er häufig übersehen wird. Um die Entstehung eines Residualtumors zu vermeiden ist ein radikales therapeutisches Vorgehen die Konsequenz. Klinisch zeigt sich der Tumor unscharf begrenzt und erinnert mit seinem Aussehen an eine Narbe. Histologisch lassen sich Stränge und Nester von Tumorzellen erkennen, die in ein dichtes, fibrotisches Stroma eingebettet sind [Megahed, 2012].
- *Infiltratives BZK*: Die blasse, harte und unklar begrenzte Plaque wird häufig erst spät diagnostiziert, da sie erst durch das Auftreten von Parästhesien und den Verlust der Sensibilität aufgrund des perineuralen Wachstums symptomatisch wird. Auffällig im histologischen Schnitt sind die dünnen Stränge von Basalzellen, welche in die Kollagenbündel infiltrieren und sich in die tieferen Gewebeschichten ausbreiten.
- *Metastasierendes BZK*: Diese Form stellt mit 0,0028-0,5% eine Seltenheit dar [Moser et al., 2014]. Eine Metastasierung lässt sich vor allem bei stark ulzerierten und infiltrativen Tumoren beobachten, sowie bei Läsionen mit großem Durchmesser.

Diagnostik

In der Diagnostik sind die klinische Untersuchung und die Dermatoskopie wegweisend. Die typischen Merkmale eines wachartigen Tumors mit perlartigem Randsaum und Teleangiektasien führen schnell zu einer Verdachtsdiagnose, welche postoperativ histologisch bestätigt wird [Plewig et al., 2012]. Auf ein Staging kann in den meisten Fällen verzichtet werden [Longo et al., 2014].

Therapie

Die Entscheidung für die geeignete Therapie ist abhängig von Größe, Lokalisation und Subtyp des Tumors und richtet sich nach einer Einteilung der Läsionen in Tumoren mit niedrigem Risiko und Tumoren mit hohem Risiko [Telfer et al., 2008]. Es besteht eine grobe Unterteilung der Therapieformen in chirurgische und nicht-chirurgische. Bei dem chirurgischen Vorgehen kann nochmals zwischen der Exzision, sowie der Destruktion (z.B. Elektrokoagulation, Kryotherapie und Laserbehandlung) unterschieden werden. Als Goldstandard gilt die chirurgische Exzision mit anschließender histologischer Untersuchung. Als besonders schonende Möglichkeit wird die mikroskopisch kontrollierte Chirurgie (MKC) vor allem bei der Exzision von Läsionen des Gesichts favorisiert. Bei dieser Methode erfolgt im ersten Schritt eine sparsame Exzision im klinisch Gesunden und eine topografische Markierung des Präparats mit Hilfe von Skizzen, Fäden oder Farbe. Anschließend werden die Exzidatschnittländer in der Histologie basal und lateral lückenlos untersucht, um bei einer weiteren Operation Tumorreste gezielt nachexzidieren zu können.

An Stelle der histologischen Aufarbeitung ist auch eine Untersuchung im Schnellschnittverfahren möglich [Hauschild et al., 2008]. Weitere Indikationen für dieses chirurgische Verfahren sind unklare Tumorgrenzen, Läsionen ab einer Größe von 2cm, aggressive histologische Subtypen, Rezidive, sowie perineurales oder perivaskuläres Wachstum.

Alternative Therapieformen bei initialen und kleinen BZK stellen die Kürettage, die Laserablation, und die Kryotherapie dar. Bei superfiziellen BZK sind die photodynamische Therapie und die Anwendung von topischen Immunmodulatoren ebenfalls erfolgversprechend [Telfer et al., 2008]. Die Radiotherapie ist eine weitere Therapiemöglichkeit, welche bei Rezidiven als adjuvante Therapie sowie für Patienten, bei denen eine Operation kontraindiziert ist, empfohlen wird [Telfer et al., 2008]. Nachteil, all dieser nicht chirurgischen Therapieoptionen ist, dass eine histologische Kontrolle des Präparatrandes nicht möglich ist und somit die Gefahr von Rezidiven erhöht ist [Longo et al., 2014]. Mittlerweile gibt es für inoperable Tumoren die Möglichkeit einer medikamentösen Tabletten-Therapie mittels „Hedgehog-Inhibitoren“, die unter anderem über eine Blockade des PTCH-Gens zu einer Rückbildung des Tumors führen können [Berking et al., 2014].

Nachsorge

Trotz geringer Rezidivrate wird eine halbjährliche Nachsorge über drei Jahre und eine anschließend jährliche lebenslange Nachsorge empfohlen. Des Weiteren sollen die Patienten angeleitet werden auf einen adäquaten Sonnenschutz zu achten und eigenständig zu beobachten ob weitere Hautveränderungen auftreten. Für Patienten mit Rezidiven oder multiplen Läsionen wird ein individuelles, engmaschiges Kontrollprogramm entworfen [Hauschild et al., 2008].

Die Prognose für Patienten die an einem BZK erkrankt sind lässt sich nach vollständiger Tumorentfernung meist als gut einstufen. Ausnahmen stellen sehr invasive Tumoren dar, die tief in die unteren Gewebeschichten reichen, sowie Tumoren mit sehr großem Durchmesser, bei denen eine Defektdeckung erschwert ist [LeBoit, 2006]. Um eine verlässliche Prognose treffen zu können müssen Tumorgöße, Lokalisation, Abgrenzung, histologischer Subtyp sowie Zeichen des aggressiven Wachstums berücksichtigt werden [Telfer et al., 2008].

2.5 Maligne Tumoren

2.5.1 Plattenepithelkarzinom der Haut

Das Plattenepithelkarzinom (PEK) der Haut ist ein Tumor epidermalen Ursprungs der lokal infiltrierend und destruierend wächst, aber nur sehr selten metastasiert. Ein langsames Wachstum, das Monate bis Jahre dauern kann, ist typisch. Ein weiteres häufig verwendetes Synonym ist der Begriff „spinozelluläres Karzinom“.

Nach dem BZK ist das PEK mit einer Inzidenz von 30 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr der zweithäufigste maligne Tumor der Haut in Mitteleuropa [Plewig

et al., 2012]. Unter den malignen Tumoren der Schleimhäute ist es der häufigste Tumor. Der Erkrankungsgipfel liegt im 70. Lebensjahr. Männer sind häufiger betroffen als Frauen [Augustin et al., 2010].

Das Risiko für eine Metastasierung liegt durchschnittlich bei ca. 5% [Breuninger et al., 2013], ist jedoch abhängig davon auf welcher Grundlage das Karzinom entstanden ist. So ist die Prognose bei Karzinomen, welche sich auf sonnengeschädigter Haut entwickelt haben mit einer Metastasierungsrate von 0,5% exzellent. Das Risiko für eine Metastasierung steigt bei Karzinomen die auf gesunder Haut entstanden sind auf 2% bis 3% und ist bei Karzinomen die sich aus einem Bowen-Karzinom entwickelt haben stark erhöht [Le-Boit, 2006]. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei vorhandener Metastasierung lediglich 20% bis 25% [Augustin et al., 2010]. PEK metastasieren primär lymphogen und bilden am häufigsten in den regionalen Lymphknoten Metastasen aus. Fernmetastasen welche deutlich seltener auftreten, befinden sich bevorzugt in der Lunge [Breuninger et al., 2013].

Das PEK kann sich sowohl auf dem Boden einer AK oder einer anderer Präkanzerose entwickeln, als auch auf chronisch-entzündlich veränderter oder sogar auf gesunder Haut. Die Risikofaktoren für die Entstehung eines PEK sind weitestgehend identisch mit denen der Präkanzerosen, wie der AK und dem M. Bowen. Dazu zählen UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, onkogene Viren, Immunsuppression und chemische Noxen wie Teer, Arsen und Ruß. Einen Kofaktor stellen chronisch-degenerative oder chronisch-entzündliche Veränderungen wie Narben oder Hautatrophien dar [Plewig et al., 2012].

Klinik

Klinisch imponiert das PEK als leicht erhabene, hyperkeratotische Plaque, als Knoten oder als Ulkus mit erhabenem Randwall. Bei fortgeschrittenen invasiven Karzinomen lässt sich eine Verdickung der Läsion mit einem Einwachsen in die Umgebung beobachten. 90% aller Läsionen sind im Kopf-Hals-Bereich lokalisiert [Breuninger et al., 2013].

Diagnostik

Die Diagnose wird meist klinisch gestellt, muss allerdings histologisch verifiziert werden. Dies kann im Rahmen einer Probebiopsie oder einer therapeutischen Exzision erfolgen. Eine Untersuchung des Lymphabflussgebiets gilt als obligat. Bei Tumoren mit einer Tumordicke von 2mm oder mehr wird eine Lymphknotensonographie empfohlen [Plewig et al., 2012]. Ein Staging kann mit Hilfe des „TNM-Schema“ der UICC oder der AJCC erfolgen. Bei beiden Systemen ist der maximale Längsdurchmesser des Tumors ausschlaggebend für die Klassifizierung. Neue Erkenntnisse zeigen jedoch, dass eine Einteilung welche sich an der maximalen vertikalen Tumordicke orientiert sinnvoller erscheint, da sie mit dem Metastasierungsrisiko zusammenhängt [Breuninger et al., 2013]. So steigt das Risiko für eine Metastasierung bei einer Tumordicke von 6mm und mehr auf 20% bis 40% [Augustin et al., 2010].

Histologie

Histologisch zeigen sich atypische, epitheliale Tumorzellproliferationen, welche die Epidermis durchbrechen und in obere und tiefere Anteile der Dermis vordringen. Wie aus dem Begriff „spinozelluläres Karzinom“ bereits hervor geht, erinnern die prominenten interzellulären Verbindungen der Tumorzellen an die Verbindungen der Zellen des *Stratum spinosum*. Da die Tumorzellen ebenfalls zur Bildung eines verhornten Plattenepithels neigen entstehen charakteristische Hornperlen innerhalb der Epidermis und der Dermis. Außerdem lassen sich eine erhöhte Mitoserate und apoptotische Keratinozyten beobachten. In der Umgebung der Tumorzellen befinden sich inflammatorische Infiltrate [Megahed, 2012]. Die WHO differenziert zwischen sechs verschiedenen histologischen Typen. Zu diesen Typen zählen das aggressive spindelzellige PEK, das akantholytische PEK, das prognostisch günstige, verruköse PEK, das PEK mit Hornbildung, das lymphoepitheliomartige PEK und das desmoplastische PEK [Breuninger et al., 2013]. Der vollständige histopathologische Befund enthält Angaben über den Subtyp des Tumors, über den größten Längsdurchmesser, über die Tiefenausdehnung und über den Zustand der Resektionsränder [Breuninger et al., 2013].

Therapie

Das therapeutische Standardvorgehen besteht in der vollständigen chirurgischen Exzision, gefolgt von einer lückenlosen histologischen Untersuchung aller Flächen des topografisch markierten Präparats. 95% aller PEK können mit Hilfe dieser Methode geheilt werden [Breuninger et al., 2013].

Die Strahlentherapie kann alternativ bei sehr großen Tumoren, Tumoren mit ungünstigen Lokalisationen und Karzinomen der Hautanhangsgebilde angewendet werden. Ebenso ist sie bei Resektionen die nicht im Gesunden erfolgen sowie bei inoperablen Tumoren indiziert [Breuninger et al., 2013]. Bei Feldkanzerisierung oder bei Auftreten multipler frühinvasiver Tumoren kommen häufig die Kürettage mit Elektrodesikkation, die Kryotherapie, die Lasertherapie oder die photodynamische Therapie zum Einsatz [Breuninger et al., 2013].

Das Ansprechen der PEK auf die systemische Therapie bei Metastasierung ist generell gut. Ein großer Nachteil besteht jedoch darin, dass diese Therapie nicht kurativ ist und es fast immer zur Entwicklung von Rezidiven kommt. Bei inoperablen Metastasen wird eine Polychemotherapie mit Cisplatin und 5-Fluoruracil empfohlen [Breuninger et al., 2013].

Eine „Sentinel-Lymphknoten-Biopsie“ wird für PEK mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko empfohlen. Bei Verdacht auf eine Lymphknotenmetastase soll eine therapeutische Lymphadenektomie erfolgen. Eine elektive Lymphknotenbestrahlung oder eine prophylaktische Lymphadenektomie sind nicht indiziert [Breuninger et al., 2013].

Nachsorge

Eine regelmäßige Nachsorge ist obligat, da es häufig zur Entstehung von Zweittumoren kommt. Die Untersuchung beinhaltet eine visuelle Inspektion, eine Palpation sowie gegebenenfalls eine Sonographie der Lymphknoten. Patienten mit einem einzelnen PEK

sollen fünf Jahre lang einmal jährlich kontrolliert werden. Für Patienten mit einem metastasierten, rezidierten oder nicht vollständig entfernten PEK wird eine alle drei Monate stattfindende Nachsorge in den ersten fünf Jahren und anschließend eine jährliche Nachsorge lebenslang empfohlen. Das gleiche gilt für Patienten mit Tumoren die einen Längsdurchmesser von 2cm oder eine Tumordicke von 6mm überschreiten [Breuninger et al., 2013]. Außerdem sollen die Patienten zur Selbstinspektion angeleitet werden und eine Aufklärung über die adäquate Anwendung von Lichtschutzmitteln erhalten.

Differentialdiagnose: Das Keratoakanthom

Die wichtigste Differentialdiagnose des PEK ist das Keratoakanthom, ein halbkugeliger, epithelialer Tumor mit einem zentralen Hornpfropf. Trotz des charakteristischen Erscheinungsbildes kann es klinisch zu einer Verwechslung mit einem PEK kommen. Histologisch bestehen ebenfalls Gemeinsamkeiten. Der entscheidende Unterschied liegt in der Wachstumsgeschwindigkeit. Das Keratoakanthom wächst innerhalb weniger Wochen und nicht selten kommt es zu einer spontanen Remission. Häufig wird es als nicht metastasierendes PEK bezeichnet [Terhorst, 2009]. Es ist noch umstritten ob das Keratoakanthom als eigenständige Entität angesehen oder als Subtyp des Plattenepithelkarzinoms eingeordnet werden soll [Zargaran and Baghaei, 2014].

2.5.2 Malignes Melanom

Das MM stellt mit einem Anteil von 90% an allen Todesfällen durch Hautkrebs den gefährlichsten Tumor der Haut dar [Augustin et al., 2010]. Die schlechte Prognose für Patienten die an diesem Tumor erkrankt sind lässt sich mit dem hohen Metastasierungsrisiko begründen. Da die Melanozyten während der Embryogenese in die Haut wandern, wachsen diese nicht im Verbund und bilden keine Verbindungen untereinander aus. Es wird vermutet, dass darin die Ursache für die häufige Ausbildung von Metastasen liegt [Plewig et al., 2012].

MM können in jeder Altersgruppe auftreten, jedoch lässt sich ein Häufigkeitsgipfel in der sechsten Lebensdekade erkennen. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen. In Mitteleuropa liegt die Inzidenz bei ca. 13 bis 15 Neuerkrankungen bezogen auf 100.000 Einwohner pro Jahr, woraus sich ein Lebenszeitrisiko von 1% errechnen lässt [Plewig et al., 2012]. Innerhalb der letzten 10 Jahre ist die Inzidenz bei Frauen um 2,8% und bei Männern um 6,1% gestiegen [Pflugfelder et al., 2013].

Zu den Risikofaktoren zählen sowohl genetische als auch umweltbedingte Einflüsse. Das Vorhandensein von mehr als fünf atypischen Nävi in Kombination mit einem Auftreten von MM in der Familie, erhöht das Risiko an einem MM zu erkranken [Pflugfelder et al., 2013]. Des Weiteren stellen Patienten mit multiplen melanozytären Nävi eine Risikogruppe dar, da ca. 30% bis 40% aller MM auf dem Boden eines melanozytären Nävus entstehen [Plewig et al., 2012]. Als Hauptrisikofaktor wird heute die UV-Strahlung angesehen. Eine hohe intermittierende UV-Belastung scheint eine große Rolle zu spielen, vor allem wenn diese bereits in der Kindheit stattfindet [LeBoit, 2006]. Bestätigt wird diese Annah-

me durch das bevorzugte Auftreten von MM bei Personen mit hellem Hauttyp. Auch die steigende Inzidenz kann mit den in den letzten Jahrzehnten stattgefunden Veränderungen der Lebensgewohnheiten erklärt werden, welche vermehrte Reisen in südliche Länder und die Zunahme von Freizeitaktivitäten im Freien beinhalten [LeBoit, 2006].

Klinik und Histologie

Das klinische Erscheinungsbild des MM ist sehr variabel. Klinisch und histologisch werden vier Subtypen unterschieden:

- *Superfiziell-spreitendes Melanom (SSM)*: Dieser Subtyp tritt mit 55% am häufigsten auf [Augustin et al., 2010]. Charakteristisch sind eine lange horizontale Wachstumsphase und ein erst spät auftretendes vertikales Wachstum. Die Läsion zeigt sich zunächst flach, wird aber zunehmend erhaben und besitzt eine glatte bräunliche bis schwarze Oberfläche. In der Regel ist die Begrenzung scharf, jedoch unregelmäßig. Histologisch lässt sich eine akanthotisch verbreiterte Epidermis erkennen, die zahlreiche große, runde Melanozyten mit einem hellen Zytoplasma enthält. Bei beginnendem vertikalen Wachstum dringen die Melanozyten auch in das Korium vor [Plewig et al., 2012].
- *Noduläres Melanom*: Da das noduläre Melanom nur eine kurze horizontale Wachstumsphase besitzt und sich frühzeitig vertikal invasiv entwickelt, gilt es als Subtyp mit ungünstiger Prognose. Es bildet einen Anteil von ca. 20% an allen MM [Augustin et al., 2010]. Klinisch imponiert ein braunes bis schwarzes Knötchen, bei dem nicht selten Ulzerationen und Blutungen auftretend können. Im histologischen Bild lassen sich spindelförmige und pleomorphe Melanozyten erkennen, welche sogar teilweise bis in die Subkutis vordringen können [Plewig et al., 2012].
- *Lentigo-maligna-Melanom*: Dieser Subtyp wird am häufigsten auf der Gesichtshaut älterer Patienten diagnostiziert und tritt in ca. 10% aller Fälle auf [Augustin et al., 2010]. Die Begrenzung ist unscharf und typische Pigmentunregelmäßigkeiten sind vorhanden. Histologisch zeigt sich eine akanthotische Epidermis mit atypischen, stark pigmentierten Melanozyten, welche in Nestern zusammen liegen und bis in das Korium infiltrieren [Plewig et al., 2012].
- *Akrolentiginöses Melanom*: Mit einem Anteil von 4% an allen MM wird das palmo-plantar und subungual vorkommende akrolentiginöse Melanom seltener diagnostiziert [Augustin et al., 2010]. Pigmentierungen der Nagelfalz welche als „Hutchinson-Zeichen“ definiert werden, sind häufig wegweisend für die Diagnose.

Das histologische Bild ist von einer akanthotisch verbreiterten Epidermis geprägt, in der sich zahlreiche zu Nestern konfluierende Melanozyten befinden. Bei fortgeschrittenem Zustand dringen diese bis ins Korium vor [Plewig et al., 2012].

Sonderformen wie das amelanotische Melanom, das Schleimhautmelanom oder das desmoplastische Melanom treten sehr selten auf. Bei 5% der Patienten bestehen ledig-

lich Metastasen, während der Primärtumor aufgrund einer vollständigen Regression nicht mehr aufzufinden ist [Plewig et al., 2012]. Histologisch zeigen sich bei allen Subtypen atypische Melanozyten, die isoliert sind oder auch in Nestern zusammen liegen. Sie sind in allen Epidermisschichten zu finden und entsprechend dem Fortschritt der Läsion auch in der Dermis und der Subkutis. Auffallend sind einzelne Tumorzellen die sich entlang der DEJ nach lateral ausbreiten. Die Tumorzellen können in verschiedenen morphologischen Varianten vorkommen und sind stets asymmetrisch verteilt. Auffallend ist auch das Vorhandensein von freiem Melanin sowie entzündlichem Infiltrat in der Dermis [Megahed, 2012].

Diagnostik und Therapie

Zur primären Diagnostik eines MM dienen die „ABCD-Regel“, die Dermatoskopie, sowie die in-vivo KLM als Hilfestellung. Kann ein MM klinisch nicht ausgeschlossen werden, wird eine Exzisionsbiopsie mit einem geringen Sicherheitsabstand von 5mm durchgeführt um durch eine histologische Untersuchung die Verdachtsdiagnose zu bestätigen. Bei der histologischen Untersuchung findet ein Staging des Primärtumors nach dem „TNM-Schema“ der AJCC statt. Für die Wahl der Therapie sind drei histologische Kriterien entscheidend. Dazu zählen die „Tumordicke nach Breslow“, das Vorhandensein einer Ulzeration und eine gesteigerte Mitoserate [Pflugfelder et al., 2013]. Des Weiteren sollte eine Klassifizierung des Tumorsubtyps nach dem Schema der WHO erfolgen. Nach gesicherter Diagnose eines MM muss innerhalb von vier Wochen eine Nachexzision erfolgen. Der Sicherheitsabstand richtet sich jeweils nach der „Tumordicke nach Breslow“.

Eine Untersuchung der regionären Lymphknoten ist bei Patienten mit einem MM obligat. Diese kann durch Palpation oder mit Hilfe der Sonografie erfolgen. Immer häufiger wird eine Exzision des Wächterlymphknotens mit einer anschließenden histologischen Aufarbeitung durchgeführt. Bei ca. 20% aller Patienten befinden sich in diesem Lymphknoten Mikrometastasen [Plewig et al., 2012]. Liegen Metastasen oder Mikrometastasen in den regionären Lymphknoten vor, so ist eine therapeutische Lymphadenektomie indiziert.

Bei Verdacht auf Fernmetastasierung, die sowohl lymphogen als auch hämatogen stattfinden kann, werden weitere Untersuchungen durchgeführt. Dazu zählen die Bestimmung der Blutwerte (S100B und LDH), sowie ein MRT des Kopfes und ein Ganzkörper-PET-CT. Die Behandlung der Fernmetastasen erfolgt je nach Lokalisation und Entwicklungsstadium chirurgisch, radiologisch oder chemotherapeutisch und ist in der Regel palliativ [Pflugfelder et al., 2013]. Bei vorhanden Metastasen oder einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Metastasen hat sich die adjuvante Therapie mit Interferon- α als erfolgreich erwiesen [Pflugfelder et al., 2013].

Nachsorge

Eine regelmäßige Nachsorge verbessert die Prognose für die Patienten mit einem MM entscheidend, da Rezidive und verzögert auftretende Metastasen frühzeitig erkannt und behandelt werden können. Die Untersuchung umfasst eine gründliche Inspektion des betroffenen Hautareals sowie des gesamten Integuments. Außerdem findet eine Palpation

und Sonografie der regionären Lymphknoten statt. Die Intervalle für die Untersuchungen richten sich nach dem Tumorstadium. In den ersten fünf Jahren werden die Patienten in der Regel alle drei bis sechs Monate untersucht und in den folgenden fünf Jahren alle sechs bis zwölf Monate. Nach zehn Jahren wird eine jährliche Nachsorge in Kombination mit einer regelmäßig stattfindenden Selbstuntersuchung als ausreichend angesehen [Pflugfelder et al., 2013].

Die Prognose ist stark abhängig von der „Tumordicke nach Breslow“ und somit dem Vorhandensein von regionären Metastasen oder Fernmetastasen. Im Durchschnitt liegt die 10-Jahres-Überlebensrate bei 75% bis 80%. Liegen Lymphknotenmetastasen vor so sinkt sie auf 20% bis 50%. Bei vorhandenen Fernmetastasen liegt die Lebenserwartung lediglich bei sechs bis neun Monaten falls keine Therapie erfolgt [Augustin et al., 2010].

3 Die ex-vivo konfokale Laserscanmikroskopie

3.1 Das konfokale Prinzip

In den letzten Jahren hat sich das konfokale Laserscanmikroskop zu einem etablierten und mittlerweile weit verbreiteten Forschungsinstrument entwickelt [Wilhelm et al., 2001]. Bereits 1957 reichte Marvin Minsky den Antrag für ein Patent auf das Prinzip der konfokalen Mikroskopie ein [Minsky, 1957]. Jedoch erst in den Jahren nach 1990 gewann das konfokale Mikroskop an Bedeutung, da erst der technische Fortschritt ermöglichte, Mikroskope zu bauen, deren Größe für den klinischen Alltag angemessen war [Hofmann-Wellenhof et al., 2012].

Nachteil konventioneller Lichtmikroskope ist, dass mit Steigerung der Vergrößerung eine Minderung der Tiefenschärfe auftritt. Der Grund dafür ist eine Überlagerung von scharfen Punkten aus der Fokusebene mit unscharfen Punkten aus Ebenen oberhalb und unterhalb der Fokusebene. Mit der Lichtmikroskopie ist eine Lösung dieses Problems nicht möglich, da die Ursache im Gesetz der geometrischen Optik sowie der Wellenoptik liegt [Cremer and Cremer, 1978].

Rasterelektronenmikroskope zeigen bei starker Vergrößerung eine hohe Auflösung und somit auch eine hohe Tiefenschärfe. Dies ist möglich, da die Wellenlänge der einzelnen Elektronen des Elektronenstrahls sehr klein ist. Der große Nachteil dieser Mikroskope ist jedoch, dass eine Betrachtung von lebendem Gewebe nicht möglich ist [Cremer and Cremer, 1978].

Mit der Erfindung des konfokalen Laserscanmikroskops konnten alle zuvor genannten Probleme gelöst werden. Mit Hilfe einfacher Objektive kann lebendes Gewebe aus Präparaten, die relativ dick und unregelmäßig sind, bei hoher Vergrößerung mit sehr großer Tiefenschärfe dargestellt werden. Ermöglicht wird dies, durch die ausschließliche Detektion des Lichts in der Fokusebene [Minsky, 1957].

Der Begriff „konfokal“ bedeutet, dass der Beleuchtungs- und der Beobachtungspunkt ineinander abgebildet werden, da sie sich auf konjugierten Ebenen befinden [Wilhelm et al., 2001]. Ein konfokales Mikroskop ist ein spezielles Auflichtmikroskop mit einer punktförmigen Lichtquelle, die nur einen Bruchteil des Präparats beleuchtet. Dieser Teil des Präparats sendet nun selbst Licht in Form von Fluoreszenzlicht oder reflektiertem Licht aus, welches über die gleiche Optik auf eine Lochblende vor dem Detektor abgebildet wird. Der Detektor misst, als lichtempfindliches Gerät, pixelweise die Intensität dieses

Lichts [Minsky, 1957]. Anschließend wird das elektrische Signal digitalisiert und erscheint auf dem Monitor als Bild [Wilhelm et al., 2001]. Nur das aus der Fokusebene des Präparats stammende Licht wird detektiert. Dies führt zu einer Erhöhung des Kontrasts und der Tiefenschärfe. Licht das aus Ebenen oberhalb oder unterhalb der Fokusebene stammt, wird durch die konfokale Lochblende abgeschirmt [Nehal et al., 2008]. Der Laser wird mit Hilfe eines Spiegelsystems in der X- und Y-Richtung abgelenkt, sodass ein quadratförmiges Areal innerhalb des Präparats aufgenommen werden kann [Li et al., 2005]. Indem die Haltevorrichtung des Objektträgers horizontal bewegt wird und der Laser so das gesamte Objekt abtastet, entsteht schließlich ein Bild des kompletten Präparats [Minsky, 1957]. Die einzelnen quadratischen Abschnitte des Präparats werden mit Hilfe einer Software zu einem Mosaik zusammengesetzt [Nehal et al., 2008].

In der konventionellen Mikroskopie werden für die Entstehung eines Bildes alle Punkte des Objekts gleichzeitig beleuchtet. Im Gegensatz dazu wird das konfokale Laserscanmikroskop als Punktsanner bezeichnet da er die einzelnen Punkte des Objekts nacheinander beleuchtet [Wilhelm et al., 2001].

3.2 Der Strahlengang des konfokalen Mikroskops

Abbildung 1 zeigt den Strahlengang eines konfokalen Laserscanmikroskops. Das vom Laser (1) ausgesandte Licht passiert zuerst eine Anregungslochblende (2) um einer punktförmigen Lichtquelle zu entsprechen. Nach Passage eines ersten Objektivs (3) das die Strahlen parallelisiert, trifft der Lichtstrahl auf einen Strahlteiler (4), der den Strahl reflektiert, um 90° ablenkt und ihn so auf das Mikroskopobjektiv (5) weiterleitet. Von hier aus gelangen die Lichtstrahlen konvergierend in das Präparat, in welchem sie auf einen Punkt fokussiert werden. Abhängig von der Wellenlänge des Lasers wird das Licht nun entweder reflektiert oder die Lichtenergie in Fluoreszenzlicht umgewandelt. In beiden Fällen läuft der Lichtstrahl divergierend zu dem gleichen Mikroskopobjektiv zurück, passiert den transparenten Anteil des Strahlteilers, sowie die Tubuslinse (8) und gelangt zu der konfokalen Lochblende (9). Die konfokale Lochblende ermöglicht lediglich dem Licht den Durchtritt das aus der Fokusebene (6) des Präparats stammt und leitet es weiter zu dem Detektor. Licht aus Ebenen oberhalb oder unterhalb der Fokusebene (7) wird blockiert und gelangt nicht zum Detektor [Wilhelm et al., 2001] [MAVIG GmbH, 2014]. Entscheidend ist, dass beide Löcher der Blenden, die Mitte des Mikroskopobjektivs, sowie der Fokuspunkt des Präparats exakt auf der optischen Achse dieses Systems liegen [Minsky, 1957].

Bei konfokalen Laserscanmikroskopen der neuen Generation, die eine Beleuchtung des Präparats mit Licht von mehr als einer Wellenlänge ermöglichen, besteht eine leichte Variation des Aufbaus. Hier existieren zwei oder drei Laser, die als Lichtquelle dienen, sowie zwei separate Detektoren, einer für den Reflexionsmodus (RM), der andere für den Fluoreszenzmodus (FM). Die Laserstrahlen werden mit Hilfe von Spiegelsystemen aus polygonalen und dichroitischen Spiegeln, welche nur einen Teil des Lichtspektrums reflektieren, gelenkt [Li et al., 2005].

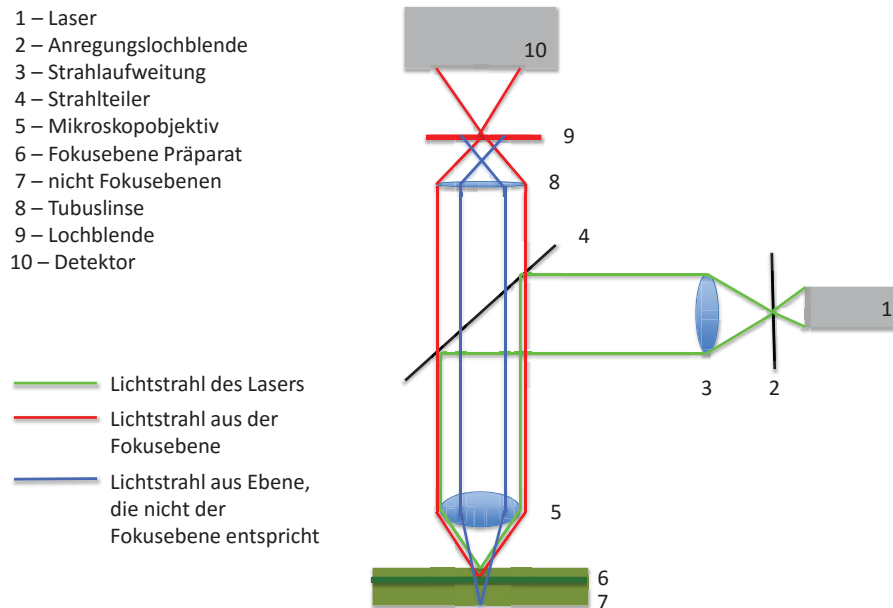


Abbildung 1: Strahlengang eines konfokalen Mikroskops [eigene Darstellung]

3.3 Die Abbildung optischer Schnitte

Die Eindringtiefe des Lichts in das Gewebe ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu zählen die Wellenlänge, die Laserstärke, das Reflexionsvermögen der oberen Hautschichten und die Streuungseigenschaften der Dermis [Nehal et al., 2008].

Das konfokale Laserscanmikroskop ermöglicht die Abbildung einer nur sehr dünnen horizontalen Präparatschicht, die als optischer Schnitt bezeichnet wird. Die Dicke dieser Schicht überschreitet eine Größe von 500nm nicht [Wilhelm et al., 2001]. Innerhalb eines bestimmten Rahmens können entlang der Z-Achse beliebig viele optische Schnitte untereinander abgebildet werden. So ist es möglich Strukturen innerhalb des Präparats auch in dreidimensionaler Ausdehnung zu verfolgen.

3.4 Der Reflexionsmodus

In diesem Modus wird ein Laser mit einer Wellenlänge von 830nm verwendet. Nachdem der Lichtstrahl das Präparat erreicht hat, wird er von den Molekülen des Gewebes reflektiert und zum Detektor weitergeleitet. Der Detektor generiert das Bild mit Hilfe der individuellen Werte der Brechungsindizes der verschiedenen Komponenten der menschlichen Haut [Nehal et al., 2008]. Je größer der Brechungsindex einer Komponente ist, desto

heller erscheint sie [Hofmann-Wellenhof et al., 2012]. Die Brechungsindices von Keratin ($\eta=1,51$), Melanin ($\eta=1,72$) und Kollagen ($\eta=1,43$) sind relativ hoch, größer als der von Wasser ($\eta=1,33$). Als stärkste natürliche Kontrastquelle gilt Melanin [Hofmann-Wellenhof et al., 2012]. Aufgrund des hohen Keratinanteils des Zytoplasmas erscheinen die Zellkerne, wenn keine Vorbehandlung des Präparats erfolgt, dunkel im Vergleich zum hellen Zytoplasma [MAVIG GmbH, 2014].

3.5 Der Fluoreszenzmodus

Im FM werden zwei Laser verschiedener Wellenlänge verwendet (488nm und 658nm). Die Wahl des Lasers richtet sich nach dem verwendeten fluoreszierenden Farbstoff. Die Moleküle des Fluoreszenzfarbstoffs binden selektiv an bestimmte Moleküle des Gewebes und werden durch die Lichtenergie des Lasers in einen energiereicheren Anregungszustand versetzt. Dieser Zustand ist nicht stabil, deshalb wird die neu gewonnene Energie schnell wieder in Form von Wärme und Fluoreszenz abgegeben [MAVIG GmbH, 2014]. Als Fluoreszenzlichtenergie wird also die absorbierte Lichtenergie bezeichnet, die um den Teil der abgegebenen Wärmeenergie reduziert wurde. Somit hat das emittierte Licht eine höhere Wellenlänge als das absorbierte Licht. Ein Emissionsfilter, der dem Detektor vorangeschaltet ist, selektiert die gewünschte Wellenlänge. Anschließend registriert der Detektor die unterschiedliche Stärke der Fluoreszenzstrahlung Komponenten, zu welchen der fluoreszierende Farbstoff eine hohe Affinität hat erscheinen hell. Der Fluoreszenzfarbstoff kann als exogene Kontrastquelle bezeichnet werden, da das Fluoreszenzlicht nicht vom Gewebe selbst, sondern von den an die verschiedenen Strukturen gebundenen Fluorophore ausgeht [Hofmann-Wellenhof et al., 2012].

4 Material und Methoden

4.1 Die Gewinnung der Gewebeproben

Die Gewebeproben dieser Studie wurden im Zeitraum von September 2014 bis Januar 2015 an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München gesammelt. Um ein möglichst breites Spektrum an untersuchtem Material zu erhalten, wurden alle exzidierten Hautveränderungen, die zur Verfügung standen in die Studie einbezogen.

Das frisch exzidierte Gewebe, welches in der operativen Abteilung gewonnen wurde, wurde umgehend mittels eines ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskops untersucht und im Anschluss sofort an das histopathologische Labor zur standardisierten histologischen Untersuchung weitergereicht. Die Untersuchungen mit dem ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskop erfolgten stets innerhalb weniger Stunden nach der Exzision der Gewebeproben, sodass der klinische und der histologische Ablauf nicht beeinflusst wurde.

Im ersten Teil der Studie wurden zunächst Gewebeproben von gesunder Haut untersucht um die Funktionsweise des ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskops zu erlernen und zur Darstellung von gesundem, nicht pathologisch verändertem Gewebe. Außerdem wurde nach möglichen Artefakten gesucht und deren Merkmale genau beschrieben. Beides war von großer Bedeutung für eine korrekte Diagnostik der pathologischen Fälle.

Im zweiten Teil der Studie wurden sowohl benigne Veränderungen untersucht, als auch Präkanzerosen und maligne Veränderungen. Zu den gutartigen Veränderungen zählten Diagnosen wie das *Condyloma acuminatum*, das *Molluscum contagiosum*, die *Akne inversa*, die *Verruca vulgaris*, die *Verruca seborrhoeica*, das *Fibroma molle* und der *Sinus pilonidalis*. Die Gruppe der Präkanzerosen wurde von der AK und vom M. Bowen dominiert. Das BZK als semimaligner Tumor machte einen großen Anteil an der Gesamtzahl der Präparate aus. Zu den untersuchten malignen Veränderungen zählten das PEK der Haut, sowie das MM. Insgesamt wurden 252 Präparate von 152 Patienten in die Studie einbezogen.

Da die Bearbeitung der Präparate in dieser Studie vertikal erfolgte, waren für die Untersuchungen nur die Gewebeproben geeignet, welche in der anschließenden histologischen Untersuchung ebenfalls vertikal geschnitten werden sollten. Somit galt das horizontale Schneiden des Präparats, das beispielsweise in der Münchner Methode der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie angewandt wird, als Ausschlusskriterium.

4.2 Die Vorbehandlung der Präparate

4.2.1 Das Schneiden der Präparate

Nach operativer Entfernung der Hautveränderungen wurde das gewonnene Gewebe zunächst für den Transport aus dem OP-Saal in den Untersuchungsraum in eine NaCl-Lösung eingelegt. Das Einlegen in Formalin wie es die konventionelle histologische Präparatbehandlung verlangt, war zu diesem Zeitpunkt nicht erwünscht, da durch die Fixierung des Gewebes eine Darstellung des Präparats im FM nicht mehr möglich gewesen wäre.

Anschließend wurde das Präparat makroskopisch beurteilt und ein repräsentatives Areal ausgewählt, aus welchem mit Hilfe eines Skalpells eine vertikale Gewebescheibe gewonnen wurde. Der horizontale Durchmesser der Gewebescheibe sollte möglichst gering sein, jedoch durfte das Gewebe nicht zerstört werden, um die konventionelle histologische Aufbereitung und Untersuchung des Präparats nicht zu gefährden. Der Hersteller des Mikroskops empfiehlt eine maximale Präparatdicke von 5mm nicht zu überschreiten.

4.2.2 Die Färbung des Gewebes

Zur Färbung des Gewebes waren stets drei Lösungen notwendig. Dazu zählten die Zitronensäure (10%; Sigma-Aldrich; St. Louis; Missouri USA), die Puffersalzlösung (Dulbecco's Phosphate buffered saline®; Sigma-Aldrich; St. Louis; Missouri USA) und ein Fluoreszenzfarbstoff. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Acridine Orange (0,6mM; Sigma-Aldrich; St. Louis; Missouri USA) und Fluorescein (Fluorescite® 0,4%; ALCON; Fort Worth; Texas USA) verwendet.

Zunächst wurde ausgewählt welche Seite der Präparatscheibe im Mikroskop beurteilt werden soll. Diese Seite zeigte während des gesamten Färbevorgangs nach unten. Der Färbevorgang beinhaltete vier Schritte [MAVIG GmbH, 2014].

- *Schritt 1:* Das Präparat wurde für 30 Sekunden in Zitronensäure 10% getaucht. Die Säure erzeugt eine Verdichtung des Chromatins im Zellkern. Das Ergebnis der Chromatinkompaktierung ist eine Kontrasterhöhung durch die nun weiß erscheinenden Zellkerne. Diese Reaktion wird als „Acetowhitening“ bezeichnet, da in früheren Studien Essigsäure anstatt der Zitronensäure verwendet wurde [Rajadhyaksha et al., 2001] [Fraschini et al., 1981]. Die Säure hat keinerlei negative Auswirkungen auf die Qualität des Gewebes. So kann die konventionelle histologische Diagnostik im Anschluss problemlos erfolgen [Rajadhyaksha et al., 2001].
- *Schritt 2:* Das Präparat wurde für ebenfalls 30 Sekunden in die Puffersalzlösung gegeben um überschüssige Zitronensäure zu entfernen.
- *Schritt 3:* Dieser Schritt diente zur Färbung des Präparates mit einem fluoreszierenden Farbstoff (s.u.) und beanspruchte, wie die vorherigen Schritte, 30 Sekunden.

- *Schritt 4:* Abschließend wurde das Präparat ein zweites Mal für 30 Sekunden in die Puffersalzlösung gegeben um die Überschüsse des Fluoreszenzfarbstoffs aus dem Gewebe zu spülen.

Der gesamte Vorgang des Färbens benötigte insgesamt also genau 2 Minuten. Ein Hauptkriterium bei der Auswahl der fluoreszierenden Farbstoffe, war das Ermöglichen einer anschließenden uneingeschränkten histologischen Diagnostik. Dieses Kriterium galt als erfüllt, wenn der Farbstoff keine irreversiblen Veränderungen im Gewebe verursachte und sich durch Formalin, in welches das Präparat im Anschluss eingelegt wurde, vollkommen auswaschen ließ.

Somit standen als Farbstoffe Acridine Orange (0,6mM) und Fluorescein (0,4%) zur Verfügung. Eine Färbung mit mehr als einer dieser Lösungen gleichzeitig war nicht möglich, da sich die Farbstoffe gegenseitig beeinflussen [MAVIG GmbH, 2014].

In dieser Studie wurde bevorzugt Acridine Orange verwendet, welches selektiv die DNS der Zellkerne anfärbt. Die ausgesandte Energie des Fluoreszenzlichts der Kerne ist 1000-fach höher, als die des umliegenden Zytoplasmas [Bennassar et al., 2014]. Eine Konzentration von 0,6mM führt zu einem Maximum an Kontrast und zu einem Minimum an Artefakten [Bini et al., 2011].

Aus einigen Präparaten wurde zusätzlich eine zweite Gewebescheibe gewonnen, die mit Fluorescein gefärbt wurde. Das Hauptanwendungsgebiet von Fluorescein liegt in der Augenheilkunde. Hier wird der Farbstoff zur Darstellung der Gefäße des Augenhintergrunds verwendet [MAVIG GmbH, 2014]. Wird Fluorescein durch blaues Licht angeregt, so senden die Fluorophore grünes Fluoreszenzlicht aus. Die Intensität des Fluoreszenzlichts und somit auch die Qualität der Fluoreszenzbilder sind stark pH-abhängig [Iimori et al., 2007]. Die Fluorophore dieses Farbstoffs binden bevorzugt an die extrazelluläre Matrix der Zellen [Chang et al., 2013].

Eine unerwünschte Folge der Belichtung der Fluoreszenzfarbstoffe ist das sogenannte „photo-bleaching“. Da die Fluorophore im angeregten Zustand instabil sind führt eine zu hohe Lichtenergie zu einer Strukturveränderung der Moleküle und somit zu einem Verlust der Fluoreszenz [MAVIG GmbH, 2014]. Um diese Reaktion zu verlangsamen, wurde die Laserenergie gering eingestellt und der Fluoreszenzfarbstoff während des Arbeitens stets vor Licht geschützt.

4.2.3 Die Fixierung der Präparate auf dem Objektträger

Nach der Färbung wurde das Präparat auf einem faserfreien Tuch abgetupft um überschüssige Flüssigkeit auf dem Objektträger zu vermeiden. Im weiteren Verlauf wurde das Präparat auf einem Objektträger positioniert und fixiert. Als Orientierungshilfe diente eine rechteckige Vorlage aus Kunststoff, auf welche der Objektträger stabil aufgelegt werden konnte. Auf dieser Kunststoffschablone war der Bereich markiert, in welchem das Präparat mittig positioniert werden sollte. Die Fixierung erfolgte mit einem zweiten Objektträger, der auf die Oberfläche des Präparats aufgelegt und seitlich mit Hilfe von zwei

Tropfen Silikon befestigt wurde. Als Haftvermittler wurde ein Zwei-Komponenten-Silikon (Regofix transparent®; Dreve; Unna; Deutschland) verwendet. Eine stabile Endhärte erreichte dieses Material nach ca. 30 Sekunden.

Ein weichbleibender, haftender Knetstoff (Blu Tack®; Bostik; Wels; Österreich) war ein weiteres Material das zur Verbindung der beiden Objektträger verwendet wurde. Vorteil dieses Materials war seine Wiederverwendbarkeit. Bei dieser Methode wurden zwei Kugeln mit einem Durchmesser von ca. 3mm geformt, auf den unteren Objektträger seitlich aufgelegt und durch den zweiten Objektträger, der als Deckglas diente, zusammenge-drückt.

Die verwendete Methode der Präparatfixierung kann als Sandwich-Technik bezeichnet werden, da das Präparat am Ende zwischen zwei Objektträgern fest positioniert ist, wie es Abbildung 2 verdeutlicht. Mit dieser Fixierung wird erreicht, dass die zu scannende Seite des Präparats, die kleine Unebenheiten besitzt, in eine 2D-Ebene gedrückt wird und somit alle Bereiche des Präparats scharf abgebildet werden können.

Nachdem diese Vorbereitungen getroffen waren, konnte mit dem Mikroskopieren und Scannen begonnen werden. Es war stets darauf zu achten die Orientierung des Objektträgers beizubehalten um sicher zu stellen, dass die gefärbte Seite während der gesamten Untersuchung nach unten in Richtung des Lasers zeigte. Außerdem wurden einige Präparate durch den Operateur seitenmarkiert um die Ränder anschließend richtig zuzuordnen zu können. Durch die unveränderte Orientierung des Präparats während den Untersuchungen war diese Zuordnung im Anschluss ebenfalls noch möglich.



Abbildung 2: Zum Scannen vorbereitetes Präparat (gelb), fixiert mit *Blu Tak*®(weiß)

4.3 Das ex-vivo konfokale Laserscanmikroskop

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir ein ex-vivo konfokales Laserscanmikroskop (Vivascope 2500 Multilaser®; Lucid Inc; Rochester NY; vertrieben von der Mavig GmbH; München; Deutschland) (Abb. 3).



Abbildung 3: Vivascope 2500®(Caliber I.D., Lucid Inc., Rochester NY)

4.3.1 Technische Daten des Mikroskops

Drei verschiedene Laser mit Wellenlängen von 488nm, 658nm (FM) und 830nm (RM) und einer maximalen Leistung von 5,01mW dienen als Lichtquelle. Die mögliche Eindringtiefe des Laserstrahls in das Präparat ist abhängig vom Gewebetyp und ist auf einen Maximalwert von 250µm limitiert. Die vertikale Auflösung beträgt 5µm. Als Objektiv wird ein 30X Wasserimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 0,9 verwendet. Dieses Mikroskop hat, ebenso wie die konventionellen Lichtmikroskope, eine Vergrößerung von 400x [MAVIG GmbH, 2014].

Auf dem Bildschirm kann ein Gewebeausschnitt mit einer Größe von 0,63mmx0,63mm angezeigt werden. Das Mikroskop ermöglicht durch Erstellung eines Mosaiks aus 1089 (33x33) einzelnen Bildern, eine zu scannende Fläche von maximal 20,8mmx20,8mm [MAVIG GmbH, 2014]. Um ein Präparat dieser maximal möglichen Größe zu scannen, benötigt das Mikroskop insgesamt 7 Minuten.

Das Mikroskop besitzt eine Halterung in welcher der Objektträger mit Hilfe zweier

Schrauben fixiert werden kann. Zur Optimierung der numerischen Apertur wurde auf die Unterseite des Objektträgers vor dem Einspannen in die Haltevorrichtung ein Tropfen (ca. 0,5ml) Ultraschallgel (Aquasonic 100®; Parker; Fairfield; NJ USA) aufgetragen. Da es sich um ein Wasserimmersionsobjektiv handelt wird normalerweise Wasser zur Optimierung der numerischen Apertur verwendet. Da dieses jedoch nicht am Ort bleibt, kann ebenso ein dickflüssigeres Ultraschallgel verwendet werden, mit welchem der gleiche Effekt erzielt werden kann.

Im Gegensatz zu älteren Generationen bietet dieses Mikroskop die Möglichkeit zwischen drei verschiedenen Wellenlängen des Laserstrahls zu wählen. Im RM wird ein Infrarotlaser der Wellenlänge 830nm mit einer maximalen Leistung von 5,0mW verwendet. Entscheidend für die Auswahl der Laserwellenlänge im FM ist die Wahl des fluoreszierenden Farbstoffs. Wird Acridine Orange (0,6mM; Sigma-Aldrich; St. Louis; Missouri USA) oder Methylen Blau (Sigma-Aldrich; St. Louis; Missouri USA) verwendet, führt der Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488nm zu einem guten Ergebnis. Für den Farbstoff Nilblau (Sigma-Aldrich; St. Louis; Missouri USA) ist der Laser mit einer Wellenlänge von 658nm besser geeignet.

4.3.2 Software des Mikroskops

In dieser Studie wurde mit der neuesten Version (Version 7) der Software *VivaScan*® von der Firma Mavig gearbeitet. Die wichtigsten Tools dieser Software sind das *VivaBlock*® und das *VivaStack*®. Wird das Präparat im *VivaBlock*® -Modus gescannt, wandert der Laser in der x-y-Ebene von Feld zu Feld und scannt das Gewebe in der zuvor vom Untersucher bestimmten Ebene. Der Modus *VivaStack*® eröffnet dem Untersucher die Möglichkeit das Gewebe in verschiedenen Ebenen entlang der z-Achse zu scannen. Hier findet keine Bewegung des Lasers in horizontaler Richtung statt. Die Kombination dieser beiden Tools ermöglicht eine dreidimensionale Beurteilung ausgewählter Strukturen.

Die dritte, häufig genutzte Funktion ist die Erstellung von Fotografien. Diese werden von dem Gewebeareal aufgenommen, welches zum Zeitpunkt des Auslösens gerade auf dem Bildschirm dargestellt wird. Die Funktion des elektronischen Zoomens entspricht der manuellen Einstellung der Objektive eines konventionellen Lichtmikroskops [Ragazzi et al., 2014]. Die Software *VivaScan*® ermöglicht durch diese Funktion eine Vergrößerung des Bildes von 1,0x auf 2,0x.

Alle aufgenommen Bilder wurden in einem Ordner gespeichert, der außerdem noch alle Patientendaten, sowie Informationen zu der jeweiligen Läsion enthielt. Das Programm zeigt eine tabellarische Übersicht aller aufgenommenen Patientenfälle, die entsprechend ihres Aufnahmezeitpunkts sortiert sind.

4.4 Die Nachbehandlung der Präparate

Nachdem alle notwendigen Aufnahmen angefertigt wurden, wurde das Präparat schonend von den beiden Objektträgern befreit und umgehend mit NaCl befeuchtet. Das Gewebe konnte im Anschluss in Formalin fixiert und in das histopathologische Labor zur konventionellen histologischen Untersuchung transportiert werden.

4.5 Der Zeitaufwand

Der Zeitaufwand für die Vorbereitung der Präparate ist insgesamt sehr gering im Vergleich zu dem Zeitaufwand der histopathologischen Untersuchung. Das Beurteilen und Schneiden der Präparate beansprucht durchschnittlich ca. eine Minute. Der Färbevorgang kann innerhalb von zwei Minuten abgeschlossen werden. Die Fixierung des Gewebes zwischen den Objektträgern, sowie das Befestigen der Objektträger im Mikroskop benötigt wiederum eine Minute. Die Zeit des Scanvorgangs richtet sich nach der Größe des Präparats und beträgt bei einer maximalen Fläche von 20,8x20,8mm sieben Minuten. Eine Beurteilung der fertig gestellten konfokalen Aufnahme ist nach insgesamt elf Minuten möglich. Werden Aufnahmen in beiden Modi benötigt verlängert sich die Zeit um weitere sieben Minuten. Für Präparate kleinerer Größe verkürzt sich die Zeit entsprechend.

Bei einigen Präparaten ist es notwendig mehr als einen Schnitt anzufertigen und zu untersuchen. Mit zunehmender Anzahl der Schnitte nimmt die benötigte Zeit ebenfalls proportional zu.

Einen Ausnahmefall bilden seitenmarkierte Präparate, da bei diesen Schnitten besonders auf die Orientierung geachtet werden muss und anschließend eine korrekte Zuordnung durch den Histologen möglich sein muss. Die häufigen Überprüfungen der Präparat-orientierung zwischen den einzelnen Arbeitsschritten, die notwendig sind um Fehler zu vermeiden, führen häufig zu einer Verlängerung der Zeit die zur Präparatbehandlung benötigt wird.

4.6 Die Archivierung der Daten

Alle erhobenen Daten und Bilder wurden pseudonymisiert auf ein externes Speichermedium exportiert.

Eine Liste mit allen Patientendaten wurde mittels *Microsoft Excel*® erstellt. Zu den Patientendaten zählten Vorname, Nachname, Geschlecht, Geburtsdatum, Operationstag, Lokalisation und Art der Läsion, sowie Art der Färbung des Präparats. Zusätzlich wurde vermerkt, ob eine präoperative fotografische, dermatoskopische oder konfokale in-vivo Aufnahme der Läsion erfolgte und ob postoperativ eine histologische Untersuchung durchgeführt wurde. Die Patienten wurden mit einer ID anonymisiert, die sich jeweils aus dem ersten Buchstaben des Vornamens, dem ersten Buchstaben des Nachnamens und dem vollständigen Geburtsjahr zusammensetzte.

Das Programm *VivaScan*® ermöglicht einen Export der einzelnen Patientenfälle. Da es sich um sehr große Bilddateien handelte (ca. 85MB) benötigte der Export teilweise bis zu neun Minuten pro Patient. Die Dauer des Exportvorgangs richtet sich nach Anzahl der aufgenommenen Fälle und Bilder. Als Speichermedium wurde eine externe Festplatte (Toshiba; Tokio; Japan) verwendet, die einen Speicherplatz von 3TB bereitstellte. Die gesamten Daten wurden im Format Bitmap (BMP) exportiert und entsprechend der IDs der Patienten auf der Festplatte geordnet. Mit Hilfe dieses Exports ist es möglich die Daten sicher zu archivieren und bei Bedarf die Bilder auf einem handelsüblichen PC erneut aufzurufen und zu beurteilen.

Da die Auflösung der exportierten Bilder zwar hoch war, jedoch nicht so hoch wie die der Originalbilder, wurden zusätzlich im Programm *VivaScan*® Screenshots erstellt. Durch das Erstellen der Screenshots wird es ermöglicht jeden beliebigen Ausschnitt eines *VivaBlocks*® in entsprechend gewünschter Vergrößerung als Einzelbild zu speichern.

4.7 Die Auswertung der Daten und Aufnahmen

Zwei speziell in der ex-vivo KLM trainierte Dermatologen beurteilten unabhängig voneinander die einzelnen Aufnahmen der Läsionen. Der korrekte Befund der jeweiligen Läsion blieb für die Dermatologen zu diesem Zeitpunkt unbekannt. Es wurden einzelne Merkmale notiert, markiert und beschrieben. Abschließend wurde eine Diagnose gestellt. Die gesammelten Befunde der beiden Dermatologen wurden anschließend miteinander und mit den Ergebnissen der konventionellen Histologie verglichen. Die Befunde der Histologie wurden als Goldstandard festgelegt. Es wurden Merkmale herausgearbeitet die sowohl in der Histologie als auch in der KLM beobachtet werden konnten und zu einer korrekten Diagnose führen. Unterschiede und Merkmale die eventuell zu Fehldiagnosen führen können, wurden ebenfalls berücksichtigt.

5 Ergebnisse

5.1 Explorative Auswertung der Daten

Explorative Statistik des gesamten Patientenkollektivs

In diese Studie wurden im Zeitraum zwischen Juni 2014 und Januar 2015 die Läsionen von 152 Patienten einbezogen. Davon waren 61% männlich und 39% weiblich. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 70 Jahren (4 bis 95 Jahre). Abbildung 4 zeigt eine Clusterung der verschiedenen Altersgruppen.

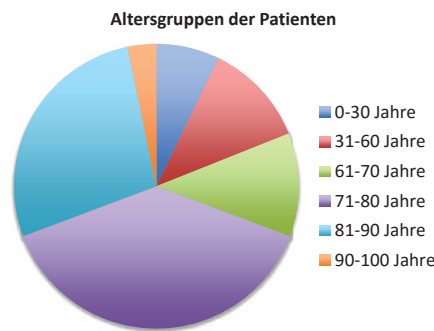


Abbildung 4: Clusterung der Altersgruppen der Patienten

Von diesen Patienten wurden insgesamt 252 Präparate exzidiert:

- 70 Präparate gesunde Haut
- 39 Präparate gutartige nicht-melanozytäre Veränderungen
- 24 Präparate gutartigen melanozytäre Veränderungen
- 27 Präparate Präkanzerosen
- 52 Präparate Basalzellkarzinome
- 29 Präparate Plattenepithelkarzinome/Bowen-Karzinome
- 8 Präparate maligne Melanome
- 3 Präparate andere Diagnosen

Die Häufigkeiten sind nochmal in Abbildung 5 veranschaulicht.

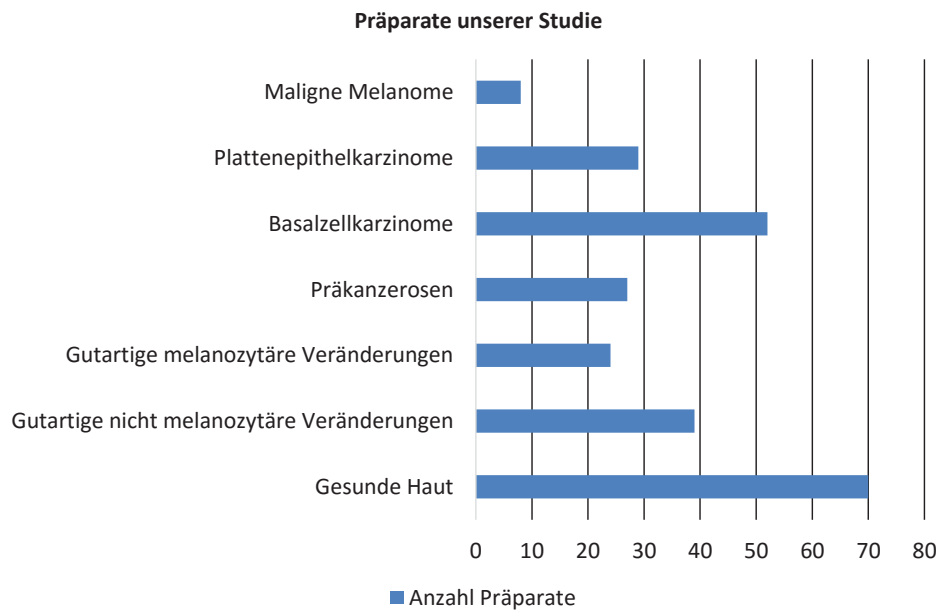


Abbildung 5: Häufigkeit der verschiedenen Hautveränderungen

Die Präparate waren an verschiedenen Regionen des Integuments lokalisiert. So stammten 148 Präparate vom Kopf und Nacken, 58 Präparate vom Stamm, 17 Präparate von den oberen Extremitäten und 29 Präparate von den unteren Extremitäten (Abb. 6).

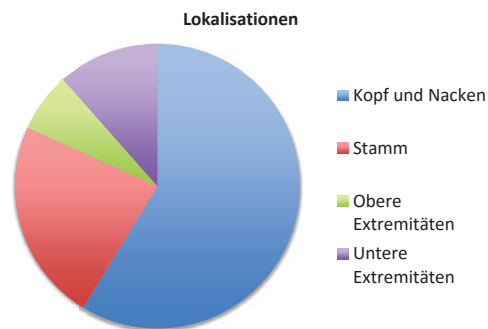


Abbildung 6: Häufigkeit der Lokalisation der untersuchten Läsionen

Im Folgenden werden die Präparate der einzelnen Diagnosegruppen nochmals genauer erläutert und analysiert. Drei Präparate wurden in die nachfolgenden Statistiken nicht mitbezogen, da sie sich keiner der Diagnosegruppen zuordnen ließen. Dazu gehörten ein

Kaposi-Sarkom, ein atypisches Fibroxanthom, und ein Keratoakanthom.

Statistik der Präparate der gesunden Haut

Von insgesamt 59 Patienten, davon 58% Männer und 42% Frauen, konnten 70 Präparate genommen werden. 50 Präparate stammten aus der Region vom Kopf und Nacken, 9 Präparate vom Stamm, 2 Präparate von den oberen Extremitäten und 9 Präparate von den unteren Extremitäten. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 70 Jahren (27 bis 94 Jahre).

Statistik der Präparate der gutartigen nicht-melanozytären Läsionen

Es wurden 39 Präparate von gutartigen nicht-melanozytären Läsionen untersucht, die von insgesamt 33 Patienten stammten (77% Männer, 23% Frauen). Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 58 Jahren (4 bis 95 Jahre). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Diagnosen, sowie die Anzahl ihres Auftretens.

Art der Läsionen	Präparate
Verruca vulgaris	5
Molluscum contagiosum	3
Condyloma acuminatum	1
Hämangiom	1
Dermatofibrom	1
Lipom	3
Fibrom	3
Neurofibrom	2
Narbe	1
Akne inversa	3
Androgenetische Alopezie	3
Rhinophym	2
Epidermalzyste	1
Verruca seborrhoeica	6
Nävus sebaceus	1
Sinus pilonidalis	1
Follikulitis	1
Ulcus cruris	1

Tabelle 1: Anzahl der verschiedenen Präparate der gutartigen nicht-melanozytären Läsionen

Statistik der Präparate der gutartigen melanozytären Läsionen

13 Patienten mit gutartigen melanozytären Läsionen wurden in die Studie mit einbezogen, davon waren 77% Männer und 23% Frauen. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 52 Jahren (5 bis 81 Jahre). Insgesamt wurden 24 Präparate untersucht. 2 Präparate stammten vom Kopf und Nacken, 18 Präparate vom Stamm, 2 Präparate von den oberen Extremitäten und 2 Präparate von den unteren Extremitäten. Tabelle 2 veranschaulicht die Anzahlen des Auftretens der verschiedenen Nävus-Subtypen.

Subtyp	Präparate
Junktionstyp	6
Compoundtyp	11
Dermaler Typ	3
Spitz-Nävus	1
Atypischer Nävus	3

Tabelle 2: Anzahl verschiedener Subtypen der Nävi

Statistik der Präparate der Präkanzerosen

In dieser Studie wurden 20 Patienten mit Präkanzerosen untersucht, davon waren 17 Patienten mit AK (53% Männer, 47% Frauen) und 3 Patienten mit M. Bowen (67% Männer, 33% Frauen). Das Durchschnittsalter der Patienten mit AK lag bei 80 Jahren (52 bis 92 Jahre) und das der Patienten mit M. Bowen bei 87 Jahren (83 bis 89 Jahre). Von den insgesamt 27 Präparaten waren 24 AK und 3 M. Bowen. Beide Läsionen waren größtenteils im Kopf-Nacken-Bereich lokalisiert (17 AK, 2 M. Bowen).

Statistik der Präparate der Basalzellkarzinome

Von insgesamt 41 Patienten mit BZK, davon 54% Männer und 46% Frauen, konnten Präparate gesammelt werden. Das Durchschnittsalter dieser Patientengruppe lag bei 77 Jahren (57 bis 95 Jahre). Es wurden 52 Präparate aus unterschiedlichen Lokalisationen untersucht (37 Kopf und Nacken, 7 Stamm, 4 obere Extremität, 4 untere Extremität). Die Anzahl der einzelnen Subtypen, ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Subtyp	Präparate
Nodulär	9
Mikronodulär	0
Oberflächlich	6
Sklerodermiform	5

Pigmentiert	0
Oberflächlich-solid	2
Solid-sklerodermiform	11
Solid-zystisch	1
Ulzeriert	7
Keine histologische Typbestimmung	11

Tabelle 3: Anzahl der verschiedenen Subtypen

Statistik der Präparate der Plattenepithelkarzinome

Mit 29 Präparaten war das PEK der am häufigsten untersuchte maligne Tumor der Haut in dieser Studie. 18 Präparate stammten vom Kopf und Nacken, 2 Präparate vom Stamm, 2 Präparate von den oberen Extremitäten und 7 Präparate von den unteren Extremitäten. Die Präparate des PEK wurden von 19 Patienten genommen, von denen 63% männlich und 37% weiblich waren. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 81 Jahren (50 bis 89 Jahre).

Statistik der Präparate der malignen Melanome

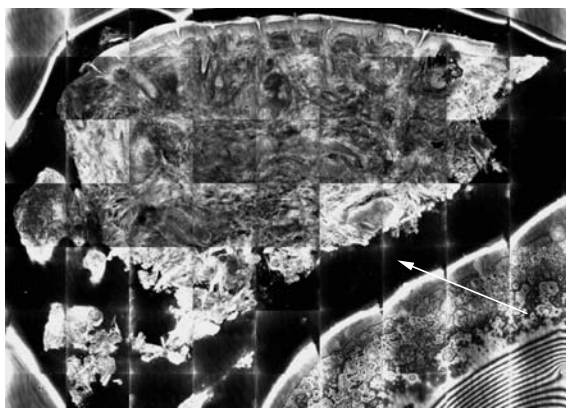
Es konnten 8 Patienten mit je einer Läsion in die Studie einbezogen werden, deren Durchschnittsalter bei 65 Jahren (39 bis 86 Jahre) lag. Die Läsionen stammten ausschließlich von männlichen Patienten. 6 Läsionen waren am Stamm lokalisiert, eine Läsion an den unteren Extremitäten und eine Läsion im Gesicht. Wir untersuchten drei superfiziell spreitende Melanome, ein noduläres Melanom, ein spitzoides Melanom, eine Lentigo maligna und zwei Hautmetastasen eines MM.

5.2 Aufnahmen der gesunden Haut in der KLM

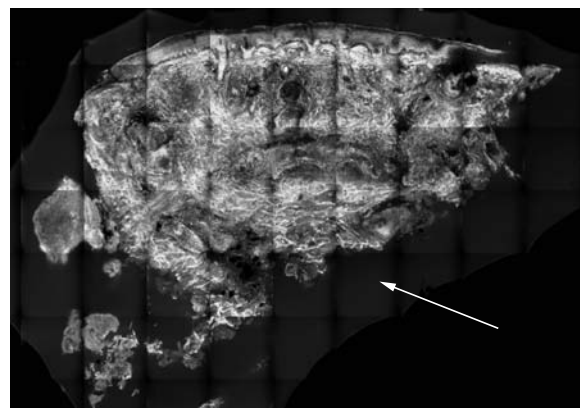
5.2.1 Aufbau und morphologische Eigenschaften der gesunden Haut

Übersichtsaufnahmen

Die Funktion der Software *VivaScan*® ein Mosaik durch die Aneinanderreihung verschiedener *VivaBlocks*® zu erstellen ermöglicht die Aufnahme eines virtuellen Bildes, welches das Präparat als Ganzes darstellt (Abb. 7). Trotz der Sichtbarkeit der einzelnen Kästchen ist die Kontinuität des Gewebes nicht unterbrochen, sodass eine Beurteilung des Präparats auch an den Grenzen der einzelnen Kästchen möglich ist. In der Übersichtsaufnahme sind die einzelnen Strukturen noch nicht klar voneinander abzugrenzen. Der schwarze Saum (Pfeil) der das Präparat umrandet wird durch die Flüssigkeit erzeugt, die während des Fixierens der beiden Objektträger aus dem Gewebe herausgepresst wird.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 7: Übersichtsdarstellung der gesunden Haut. Färbung: Acridine Orange [Hartmann et al., 2015b]

Die Epidermis

Die Keratinozyten der Epidermis zeichnen sich durch ihre polygonale Form sowie die hell erscheinenden Kerne und ihr dunkles Zytoplasma aus. Der Schichtaufbau der Epidermis lässt sich in den konfokalen Bildern sehr gut erkennen und beurteilen. Im *Stratum basale* (Pfeil) sind die Zellkerne besonders groß und oval geformt, während sie im Verlauf des *Stratum spinosum* (Pfeilspitze) kontinuierlich kleiner und flacher werden. (Abb.8)

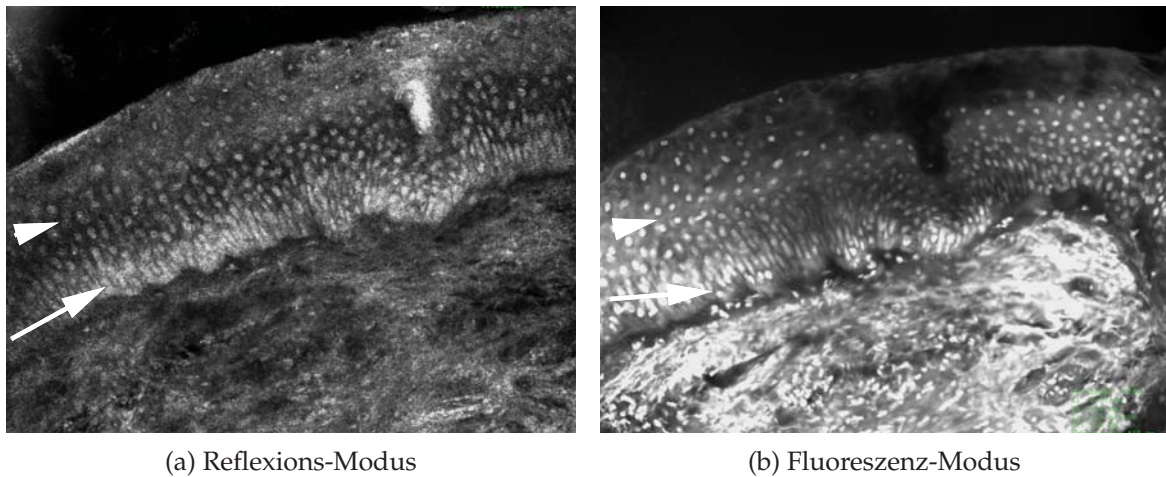


Abbildung 8: Schichten der Epidermis. Färbung: Acridine Orange [Hartmann et al., 2015b]

In Abbildung 9 lässt sich das *Stratum corneum* (Pfeilspitze) gut erkennen. Da sich in der oberflächlichen Schicht des *Stratum corneum* keine Zellkerne mehr befinden erscheint sie im FM dunkel. Im RM hingegen leuchtet sie weiß aufgrund des hohen Keratingehalts. Unterhalb des *Stratum corneum* befindet sich das aus nur einer Zellschicht bestehende *Stratum granulosum* (Pfeil).

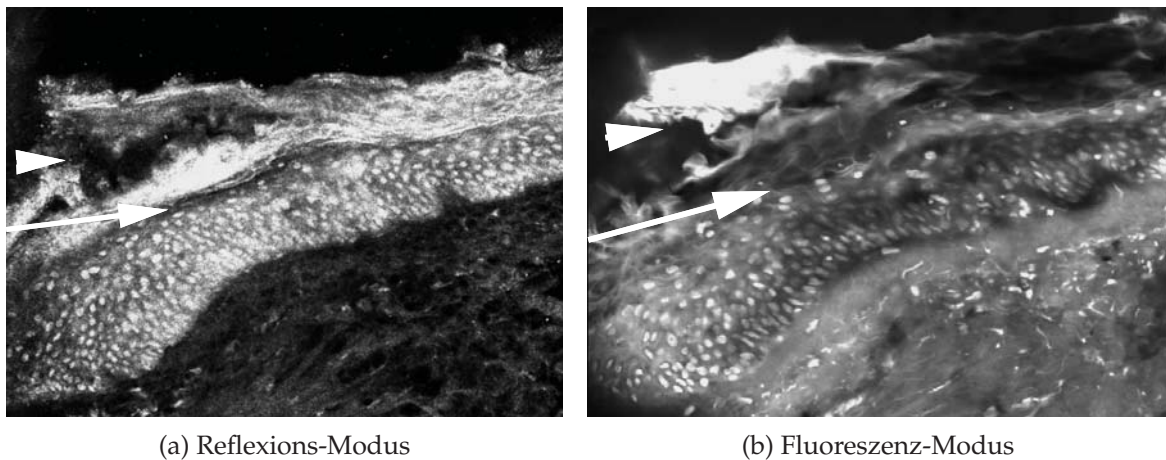


Abbildung 9: *Stratum corneum* der Epidermis. Färbung: Acridine Orange

Vom *Stratum basale* zum *Stratum corneum* verkleinert sich der helle Zellkern zu Gunsten des dunklen Zytoplasmas, welches an Volumen gewinnt. Die Zellgrenzen der Keratinozyten lassen sich deutlich erkennen (Abb. 10a). Durch den hohen Melaningehalt (Brechungsindex 1,72) in den Melanosomen stellen sich die Melanozyten (Pfeil) sehr hell im Vergleich zu den benachbarten Keratinozyten (Brechungsindex 1,51) dar (Abb. 10b).

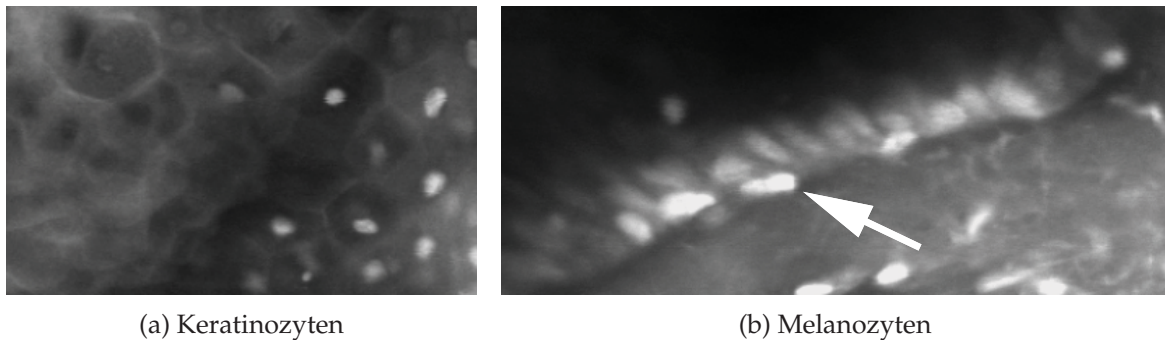


Abbildung 10: Keratinozyten im *Stratum corneum* im FM (a) und Melanozyten im *Stratum basale* im FM (b). Färbung: Acridine Orange [Hartmann et al., 2015b]

Die dermoepidermale Junctionszone

Die DEJ (Pfeil) kann als ein homogenes Band zwischen der Epidermis und der Dermis beschrieben werden. Sie trennt diese beiden Schichten sichtbar voneinander. Im RM ist dieses Band dunkelgrau und scheint zur Dermis und Epidermis einen unscharfen Übergang zu bilden (Abb. 11a). Im FM verläuft die Abgrenzung des mittelgrauen Bandes zur Epidermis sehr scharf während die Grenze zur Dermis fließend ist (Abb. 11b).

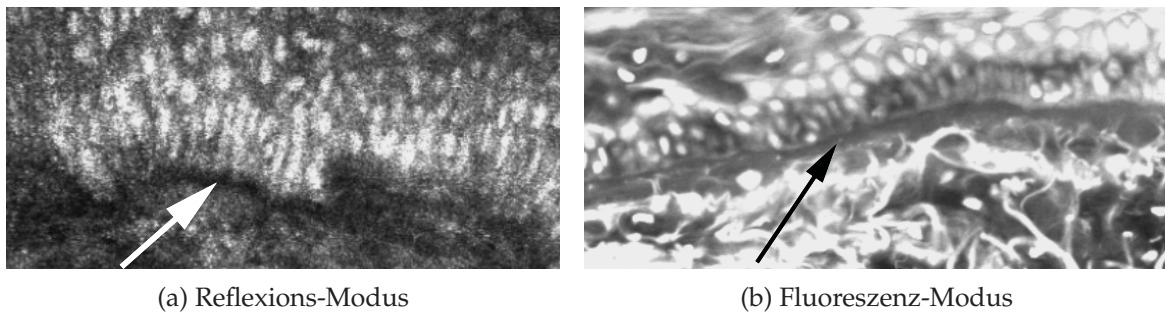
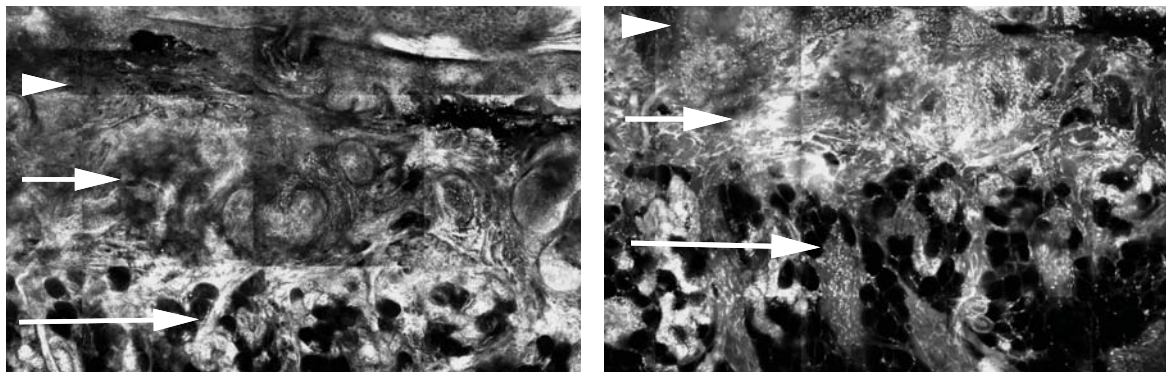


Abbildung 11: Dermoepidermale Junctionszone. Färbung: Acridine Orange

Die Dermis

Der zweischichtige Aufbau der Dermis in den konfokalen Bildern ist der Darstellung in den histologischen Schnitten sehr ähnlich (Abb. 12). Dominierend sind die sehr hellen kollagenen sowie elastischen Fasern, welche vor allem im unteren *Stratum reticulare* (kurzer Pfeil) zu finden sind. Das *Stratum papillare* (Pfeilspitze) beherbergt punktförmige Strukturen, die entweder als Lymphozyten oder als Fibroblasten identifiziert werden können. Zahlreiche Talgdrüsen und ekkrine Schweißdrüsen befinden sich an der Grenze zwischen Dermis und Subkutis. Das subkutane Fettgewebe wird bei der hier angewandten Präparatbehandlung im Gegensatz zur histologischen Vorbehandlung weniger stark herausgewaschen. Es kann sicher von der Dermis abgegrenzt werden, da es sehr dunkel, sogar fast schwarz erscheint (langer Pfeil).



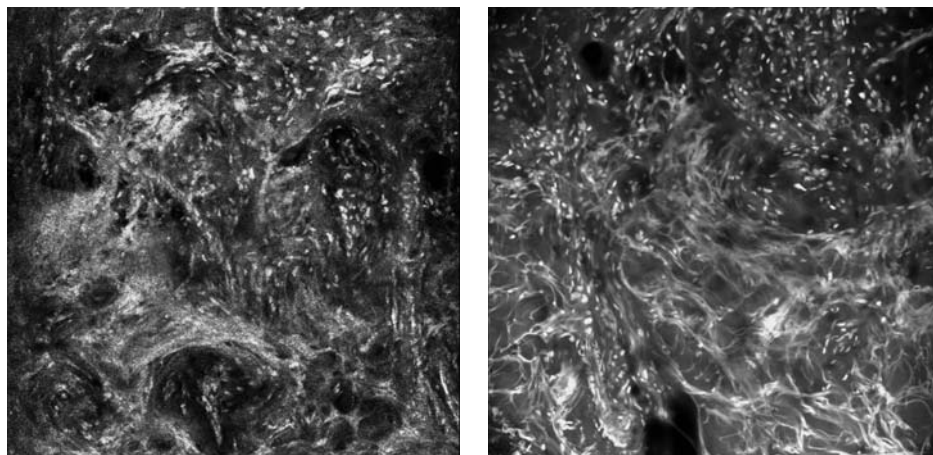
(a) Reflexions-Modus

(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 12: Aufbau der Schichten der Dermis. Färbung: Acridine Orange

Die kollagenen Fasern

Da Kollagen mit einem Wert von 1,43 einen relativ hohen Brechungsindex besitzt, stellen sich die Kollagenfasern der Dermis im RM hell und kontrastreich im Vergleich zum Stroma dar. Sie bilden ein weißes, netzartiges, verzweigtes Geflecht. Im FM sind die Fasern noch deutlicher zu erkennen als im RM (Abb. 13).



(a) Reflexions-Modus

(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 13: Kollagene Fasern. Färbung: Acridine Orange

Der Haarfollikel

Das ex-vivo konfokale Laserscanmikroskop stellt den Haarfollikel in unterschiedlichen Graustufen dar, sodass sich die verschiedenen Bereiche genau differenzieren lassen. Im RM zeigen sich die zentrale Medulla und Kortex schwarz (kurzer Pfeil), die Zellen der äußeren und inneren Wurzelscheide hingegen hellgrau (langer Pfeil). Die beiden Schich-

ten der Wurzelscheiden lassen sich nicht genau unterscheiden. Die bindegewebige Wurzelscheide, welche die äußere Wurzelscheide umgibt, ist dunkelgrau. In direkter Nachbarschaft zum Haarbulbus (große Pfeilspitze) befindet sich die Talgdrüse (kleine Pfeilspitze) (Abb. 14a). Im FM stellen sich die Medulla und Kortex hellgrau mit hell leuchtenden Zellkernen dar (kurzer Pfeil), während die Wurzelscheide sich durch ihre dunkelgraue Farbe (langer Pfeil) kaum von dem umliegenden Gewebe unterscheidet. Auffallend sind jedoch die einzelnen weißen Zellkerne, die sich deutlich vom Hintergrund abheben. Bulbus und Papille leuchten hell (große Pfeilspitze). Die benachbarte Talgdrüse ist in dieser Abbildung nicht zu erkennen (Abb. 14b).

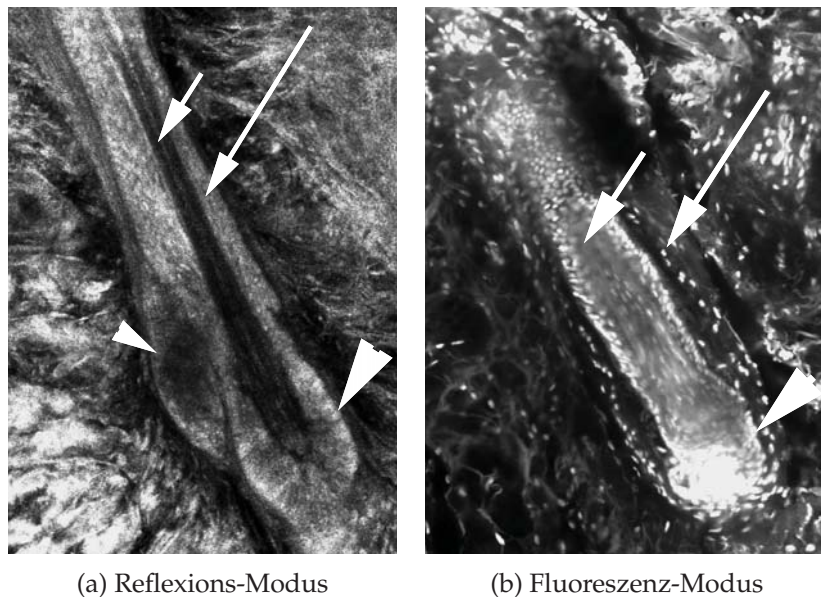


Abbildung 14: Aufbau eines Haarfollikels. Färbung Acridine Orange [Hartmann et al., 2015b]

Die holokrine Talgdrüse

Die holokrinen Talgdrüsen lassen sich vor allem im RM gut erkennen. Sie sind hellgrau, besitzen eine kugelige bis ovale Form und sind von der dermalen Matrix durch einen dunkelgrauen Saum abgegrenzt. Den äußersten Ring der Talgdrüse bilden die Matrixzellen, die für die Entstehung neuer Zellen verantwortlich sind, welche die abgestorbenen Zellen des zentralen Anteils ersetzen. Die körnige Struktur der Talgdrüse innerhalb des äußeren Rings wird durch die Lipidtröpfchen der prall gefüllten Zellen hervorgerufen (Abb. 15a). Im FM ist es hingegen schwieriger die Talgdrüsen eindeutig abzugrenzen. Sie stellen sich als inhomogene Aggregate aus großen Zellen dar, welche aufgrund des hohen Lipidgehalts nur schwach fluoreszieren. Bevor die Apoptose der zentralen, mit Talg gefüllten Zellen stattfindet, nimmt der Kern bizarre Formen an. Dieser Effekt ist hier sehr gut zu beobachten, da die Kerne weiß erscheinen (Abb. 15b).

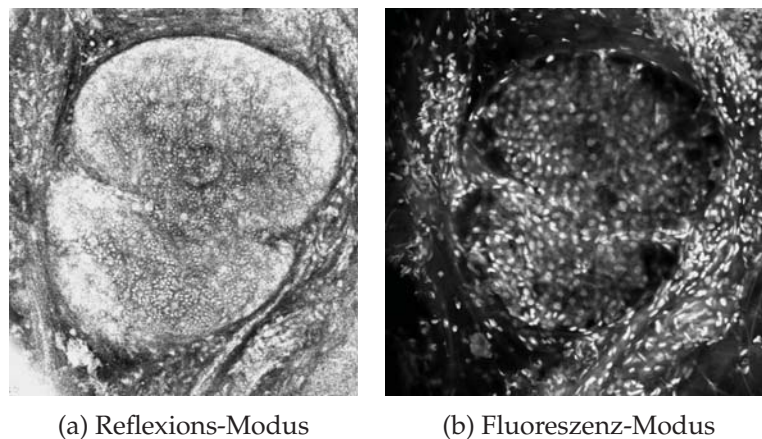


Abbildung 15: Aufbau einer holokrinen Talgdrüse. Färbung Acridine Orange [Hartmann et al., 2015b]

Die ekkrine Schweißdrüse

Die ekkrinen Schweißdrüsen sind tubuläre Drüsen die schlangenartig gewunden und meist zu einem großen Knäuel aufgewickelt sind. Hauptsächlich sind sie in den tiefen Schichten der Dermis lokalisiert. Bei einem Schnitt durch eine Schweißdrüse werden die tubulären Strukturen in unterschiedlichen Winkeln angeschnitten und zeigen ein schwarzes Lumen. In beiden Modi heben sich die weißen Strukturen der Schweißdrüsen deutlich von der dermalen Matrix ab. Zum einen können Ausführungsgänge (Pfeil) erkannt werden, die ein isoprismatisches doppelreihiges Epithel besitzen, das weiß fluoresziert. Zum anderen werden auch sezernierende Endstücke (Pfeilspitze) abgebildet, die durch ein einschichtiges isoprismatisches Epithel gekennzeichnet sind (Abb. 16).

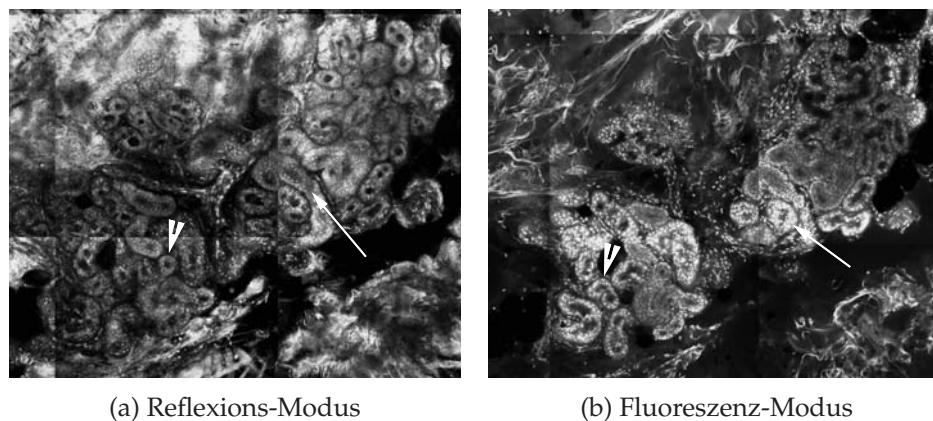
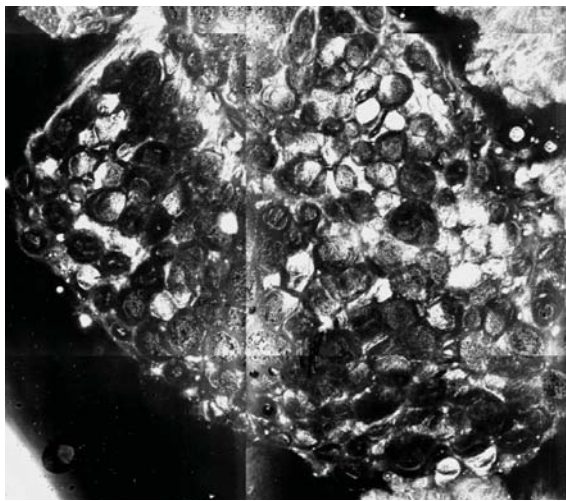


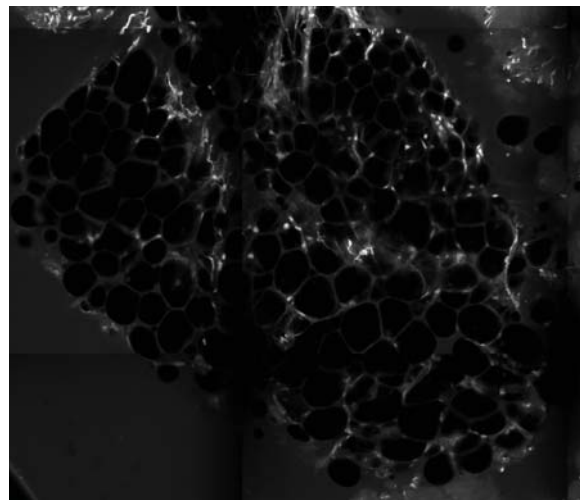
Abbildung 16: Aufbau einer ekkrinen Schweißdrüse. Färbung: Acridine Orange [Hartmann et al., 2015b]

Das Fettgewebe

Da die Abbildung des Fettgewebes in der ex-vivo KLM sehr charakteristisch ist, lässt sich das Fettgewebe leicht von den benachbarten Strukturen differenzieren. Im RM erscheinen die dicht aneinander gedrängten Fettvakuolen teilweise fast schwarz und teilweise sehr hell oder sogar weiß. Nicht immer können die einzelnen Vakuolen klar voneinander abgegrenzt werden, da die Membranen der einzelnen Zellen sehr dünn sind und keinen starken Kontrast zu den Lipidtropfen bilden (Abb. 17a). Im FM erscheinen die einzelnen Fettvakuolen ausnahmslos tief schwarz. Die Membranen der einzelnen Fettzellen und ihre Zellkerne stellen sich hier deutlicher dar, da sie hellgrau leuchten (Abb. 17b).



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 17: Fettgewebe der gesunden Haut. Färbung Acridine Orange [Hartmann et al., 2015b]

Durch die pralle Füllung der Fettzellen mit Lipiden werden ihre weiß leuchtenden Kerne (langer Pfeil) stark in die Peripherie der Zelle gedrückt. Da die Kerne im FM weiß erscheinen und in starkem Kontrast zu den dunklen Fettvakuolen stehen, lässt sich dieser Effekt hier besonders gut beobachten (Abb. 18). Auch die Zellmembranen (kurzer Pfeil) die hellgrau leuchten können leicht erkannt werden.

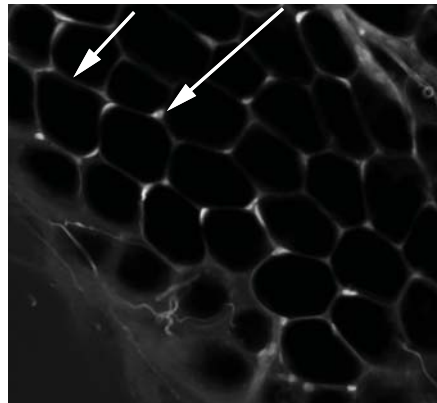
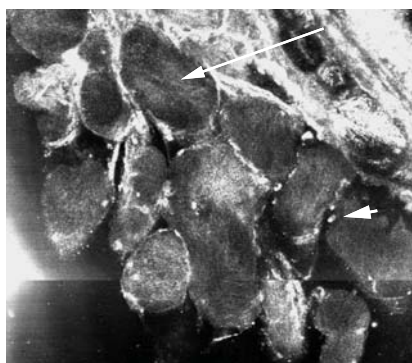


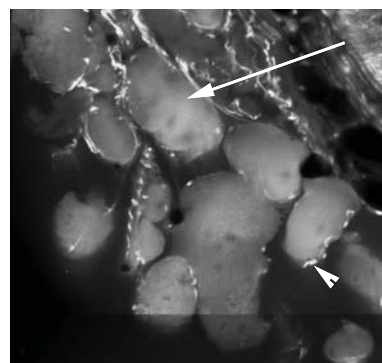
Abbildung 18: Fettvakuolen der Subkutis im FM. Färbung Acridine Orange

Das Muskelgewebe und das Nervengewebe

In einigen Präparaten der gesunden Haut ließ sich Muskelgewebe identifizieren. Dies stammte zum einen vom *M. arrector pili* und zum anderen aus Muskelsträngen der tieferen Hautschichten. Wird die quergestreifte Muskulatur quer angeschnitten, so lassen sich die einzelnen Muskelfasern voneinander abgrenzen. Im RM erscheinen die Muskelfasern (Pfeil) mittel- bis dunkelgrau und sehr homogen. Die gebündelten Myofibrillen deuten sich durch ein zartes punktförmiges Muster an. Zwischen den einzelnen Muskelfasern erscheint das kollagene Bindegewebe, das *Endomysium*, weiß bis hellgrau. Die periphere Lage der Kerne (Pfeilspitze) dieser Riesenzellen ist charakteristisch (Abb. 19a). Im FM zeigen sich die Muskelfasern (Pfeil) homogen und hellgrau. Die Myofibrillen lassen sich nicht differenzieren. Das Bindegewebe, welches die Zwischenräume füllt, ist schwarz. Die Zellkerne fluoreszieren hier weiß (Pfeilspitze) (Abb. 19b).



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 19: Quergestreifte Muskulatur quer angeschnitten. Färbung: Acridine Orange [Hartmann et al., 2015b]

Abbildung 20 zeigt das Muskelgewebe stark vergrößert. Durch die hohe Auflösung lässt sich in dieser Aufnahme sogar die Querstreifung der längs angeschnittenen Muskelfasern erkennen, welche durch die Sarkomere entsteht (Pfeil). Im FM ist dieses Phänomen noch deutlicher dargestellt als im RM.

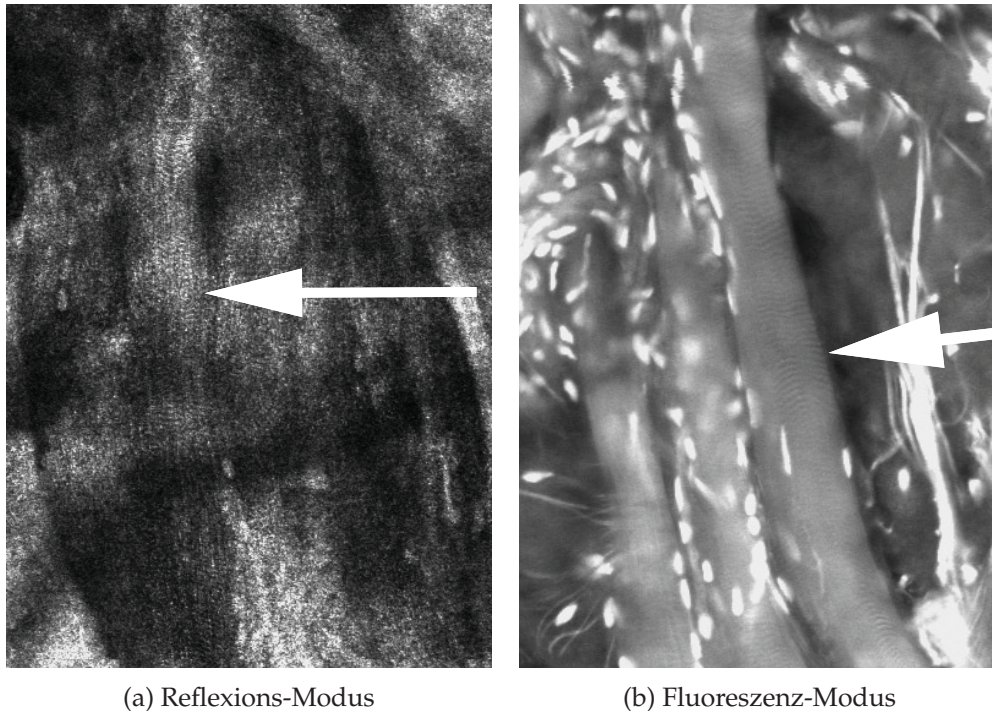


Abbildung 20: Quergestreifte Muskulatur längs angeschnitten mit Darstellung der Sarkomere. Färbung: Acridine Orange

Abbildung 21 zeigt ein Präparat in welchem ein Nerv quer angeschnitten wurde. Im RM erscheint das zentrale bindegewebige *Endoneurium* (Pfeilspitze), welches Nervenfasern, Gefäße und Schwann'sche Zellen beherbergt, schwarz. Die konzentrischen weißen Ringe um das schwarze Zentrum werden durch das *Perineurium* (kurzer Pfeil) gebildet, welches das Nervenfaserbündel umhüllt. Dieses verschmilzt in der Peripherie des Nervs mit dem *Epineurium* (Abb. 21a). Im FM stellt sich das *Endoneurium* (Pfeilspitze) homogen, mittelgrau dar. Die konzentrischen Ringe des *Perineuriums* und *Epineuriums* (Pfeil) sind weniger deutlich zu erkennen. Auffallend sind die einzelnen weißen Zellkerne innerhalb der gesamten Struktur (Abb. 21b).

Im linken Teil des Bildes wurde der Nerv längs angeschnitten (langer Pfeil). Die einzelnen Nervenfasern sind als längliche parallele Linien zu erkennen. Ein abwechslungsreiches Bild aus hellen und dunkeln Strängen ergibt sich. Das Bild im RM (Abb. 21a) gleicht dem Bild des FM (Abb. 21b).

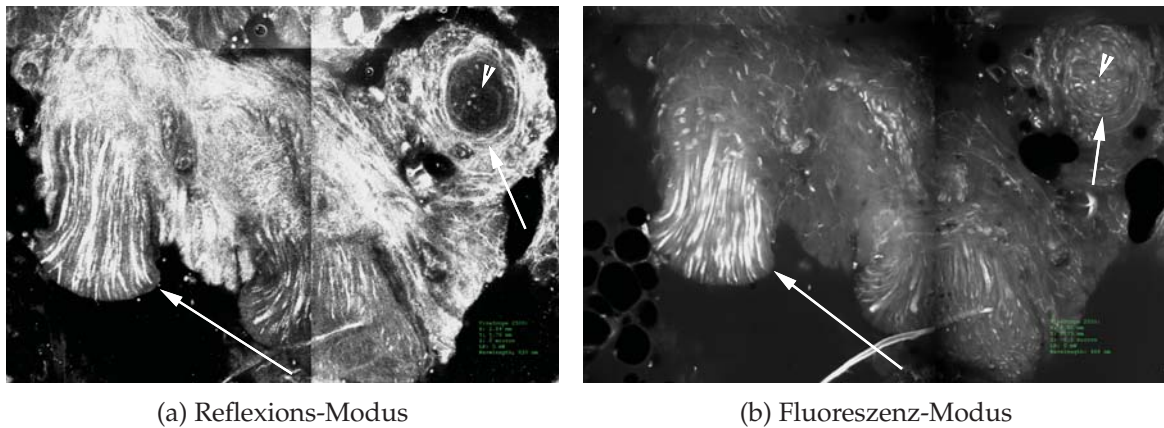


Abbildung 21: Quer und längs angeschnittener Nerv. Färbung: Acridine Orange [Hartmann et al., 2015b]

Die Blutgefäße

Im Präparat der Abbildung 22 wurde die *A. temporalis superficialis* quer angeschnitten. Im RM stellt sich das Gefäß als ovaler, heller Ring mit einem unregelmäßigen, schwarzen Lumen dar. Die Struktur der glatten Muskulatur erscheint faserreich und ist teilweise dunkel schattiert (Abb. 22a). Das Gefäßlumen im FM ist ebenfalls schwarz. Die glatte Muskulatur ist hellgrau und unregelmäßig mit weiß leuchtenden Fasern durchzogen (Abb. 22b). Eine Unterscheidung zwischen den Schichten der *Tunica interna*, *Tunica media* und der *Tunica externa* ist bei diesem Präparat nicht möglich.

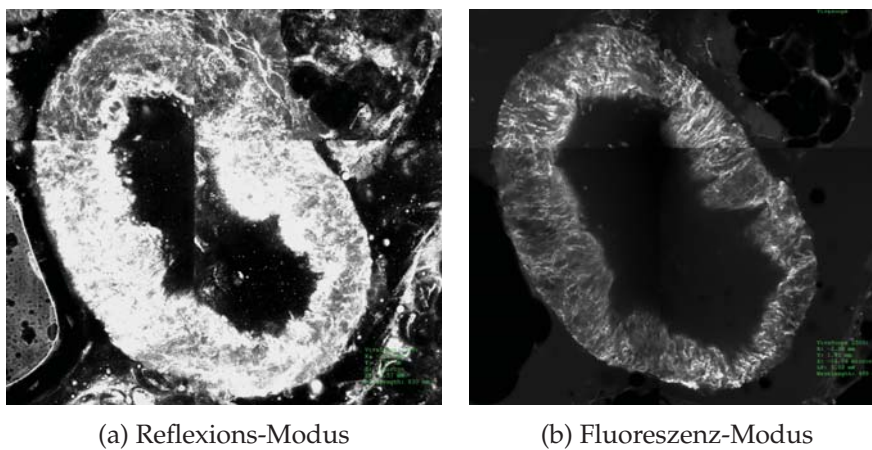


Abbildung 22: Quer angeschnittenes Gefäß. Färbung: Acridine Orange [Hartmann et al., 2015b]

5.2.2 Vergleich verschiedener Färbungen der gesunden Haut

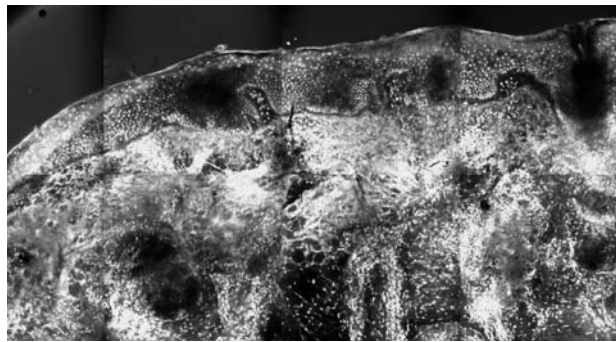
Bei der Auswahl des Fluoreszenzfarbstoffes standen zwei verschiedene Farbstoffe zur Verfügung: Acridine Orange und Fluorescein.

Die Unterschiede zwischen diesen Färbungen ließen sich ausschließlich im FM erkennen. Acridine Orange bindet selektiv an die basophilen Strukturen der Haut, wie zum Beispiel an die DNS der Zellkerne. Die gefärbten Strukturen erscheinen im FM sehr hell im Vergleich zu ihrer Umgebung. Die zellreiche Epidermis strahlt viel Fluoreszenzlicht ab, ebenso wie die Fasern und Entzündungszellen in der Dermis (Abb. 23).

Die Fluorophore des Fluoresceins binden vor allem an die extrazelluläre Matrix und an die Aminogruppen von Proteinen. Auffällig bei den mit Fluorescein gefärbten Präparaten, ist die kontrastreiche helle Epidermis. Die gesamte Dermis erscheint dunkel oder sogar schwarz (Abb. 24).

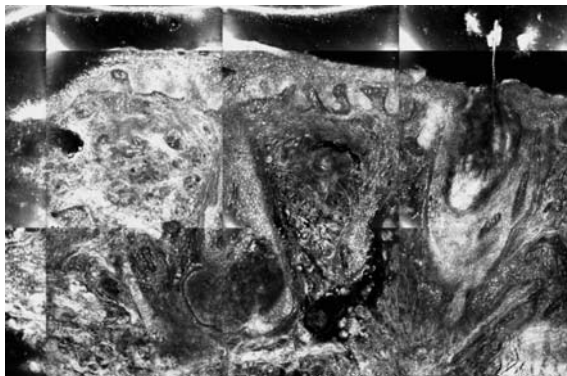


(a) Reflexions-Modus

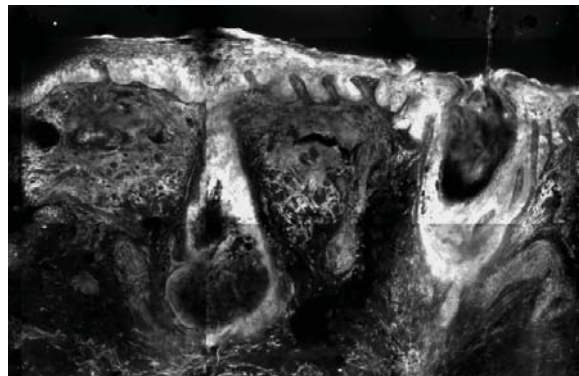


(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 23: Präparat der gesunden Haut in Acridine Orange.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 24: Präparat der gesunden Haut in Fluorescein.

5.2.3 Vergleich der Eigenschaften der einzelnen Schichten der gesunden Haut in der ex-vivo KLM und der konventionellen Histologie

Die folgende Tabelle stellt die morphologischen Eigenschaften der gesunden Haut in der ex-vivo KLM den histologischen Eigenschaften der gesunden Haut gegenüber. Ein Vergleich der Eigenschaften erfolgt für die einzelnen Schichten der Haut getrennt. Ebenfalls werden die Eigenschaften der Hautanhangsgebilde gegenübergestellt.

Anatomische Struktur	Eigenschaften in der ex-vivo KLM	Eigenschaften in der Histologie
Stratum corneum ↓ 0-15 μ m	Zahlreiche Schichten grauer, flacher, kernloser, polygonaler Keratinozyten (10-30 μ m), umgeben von einer dünnen hellen Zellmembran	Zahlreiche Schichten pinker, flacher, kernloser Keratinozyten
Stratum granulosum ↓ 15-20 μ m	Scharf begrenzte, polygonale graue Zellen (25-35 μ m) mit körnigem Zytoplasma und runden bis ovalen Zellkernen	Kernhaltige Keratinozyten mit pinkem (eosinophil) Zytoplasma mit dunklen Granula und dunkelblauen bis violetten Zellkernen
Stratum spinosum ↓ 20-100 μ m	Große, graue, polygonale Zellen (15-25 μ m) mit hellem, zentralen Zellkern	Wenige Schichten polygonaler, stacheliger Zellen mit pinkem Zytoplasma und zentralem violetten Zellkern
Stratum basale ↓ 50-100 μ m	Nester von hellen, kleinen, kubischen Keratinozyten (7-12 μ m) mit großen Zellkernen und wenig Zytoplasma	Kubische Zellen die dunkler als die Zellen des Stratum spinosum erscheinen
Dermoepidermale Junktionszone ↓ 100-120 μ m	Grades bis welliges, graues oder schwarzes Band zwischen Epidermis und Dermis	Verflochtenes hell pinkes, durchgehendes Band
Subkutis	Regelmäßige, netzartige Schichten aus großen, dunklen Zellen mit dünnen, hellen Zellmembranen und hellen, peripher liegenden Zellkernen; Fettvakuolen, die leer erscheinen	Regelmäßige, netzartige Schichten aus großen Zellen mit weißen, lipidreichen Fettvakuolen und violetter peripher gelegenen Zellkernen

Haarfollikel	Dunkler Haarschaft umrandet von hellen Wurzelscheiden mit säulenartig strukturierten Zellen; Die Matrix um die Papille ist die hellste Struktur; <i>M.arrector pili</i> zeigt sich als Ansammlung feiner, grauer Fasern mit kleinen weißen Punkten (Zellkerne)	Haarschaft als Säule aus pinken bis braunen, verhornten Zellen, die vom Haarfollikel ausgestoßen werden; <i>M.arrector pili</i> zeigt sich als Ansammlung eosinophiler Fasern mit violetten, länglichen Zellkernen
Talgdrüse	Große, runde, scharf begrenzte Struktur; gefüllt mit zahlreichen runden Zellen mit hellen Zellkernen und grauem, körnigem, vakuolenhaltigem Zytoplasma	Helle Talgzellen mit zentralem, dunklen Zellkern und zahlreichen Lipiden
Schweißdrüse	Knäulförmige Struktur mit einem, durch ein zweischichtiges Epithel begrenzten, Ausführungsgang	In der Dermis liegende Schläuche aus großen, kubischen Zellen, die zu einem kompakten Knäul verdreht sind ; Der Ausführungsgang wird durch ein zweischichtiges kubisches Epithel begrenzt

Tabelle 4: Gegenüberstellung der Eigenschaften der gesunden Haut in der ex-vivo KLM und in der Histologie (HE-Färbung)(Überarbeitet nach [Hartmann et al., 2015b])

5.3 Aufnahmen der Artefakte in der KLM

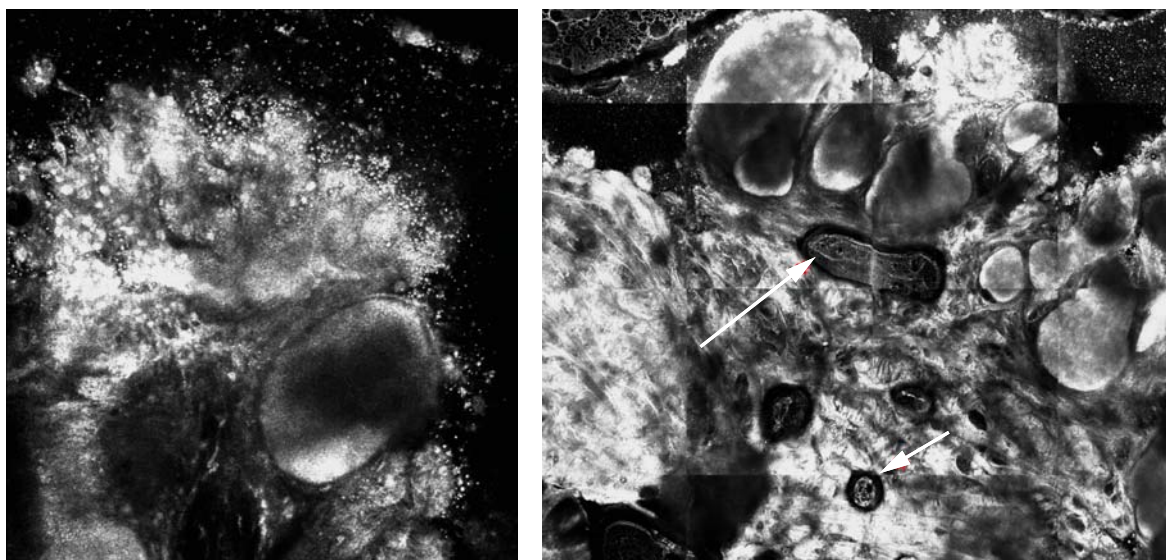
Im Verlauf der Studie kam es zu verschiedenen Komplikationen bei der Vorbehandlung des Gewebes und während des Scanvorgangs. Diese führten zum Teil zu sichtbaren Artefakten in den mikroskopischen Bildern. Im Folgenden werden die einzelnen Artefakte erläutert.

Silikon im Präparat

Wird beim Aufkleben des Deckglases auf den Objektträger eine zu große Menge Silikon verwendet, kommt dieses mit dem Gewebe in Kontakt.

Abbildungung 25a zeigt den Rand eines Präparats das vollständig mit Silikon benetzt ist. Das Silikon stellt sich in Form von sehr kleinen, weißen Punkten dar, die an einen Sternenhimmel erinnern. Sie machen es unmöglich die verschiedenen anatomischen Strukturen der Haut zu erkennen.

Vereinzelte Silikonareale (Pfeile) innerhalb eines Präparates erscheinen als scharf abgegrenzte, helle, tropfenförmige Bereiche mit dunklen Anteilen, die von einem schwarzen Saum umgeben sind (Abb. 25b).



(a) Silikontropfen am Rand

(b) Silikontropfen in der Mitte

Abbildungung 25: Präparate der gesunden Haut mit einem Silikontropfen im RM. Färbung: Acridine Orange [Hartmann et al., 2015b]

Ein weiteres Problem bei der Aufbringung einer zu großen Menge Silikon ist, dass ein vollständiges Zusammendrücken der beiden Objektträger nicht mehr möglich ist. Dies führt dazu, dass das Präparat nicht gleichmäßig flach auf dem unteren Objektträger auf-

liegt und somit ein unscharfes Bild entsteht (Abb. 26).

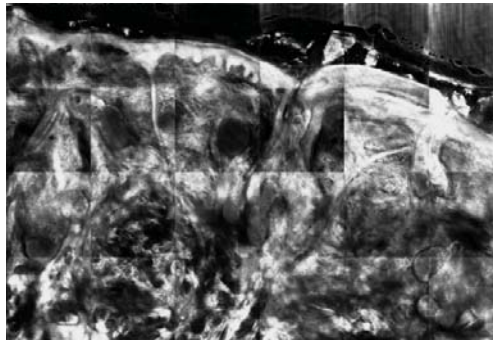


Abbildung 26: Unscharfes Präparat der gesunden Haut, das mit einer zu großen Menge Silikon fixiert wurde im RM. Färbung: Acridine Orange

Fasern der Kompresse im Präparat

Beim Schneiden des Präparats mit dem Skalpell auf einer Kompresse als Unterlage können die Fasern der Kompresse angeschnitten werden und am Gewebe haften. Werden diese anschließend nicht entfernt und zusammen mit dem Präparat gescannt, sind sie im mikroskopischen Bild sichtbar (Pfeile). Sie erscheinen als weiße dicht beisammen liegende Stäbchen, die scharf begrenzt sind. Sie erschweren die Beurteilung des Präparats und können in einigen Fällen sogar zu einer fehlerhaften Diagnose führen. Im FM lassen sich die Fasern noch besser erkennen als im RM (Abb. 27).



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 27: Fasern einer Kompresse in einem Präparat der gesunden Haut. Färbung Acridine Orange [Hartmann et al., 2015b]

Scannen der falschen Präparat-Seite

Während des gesamten Vorgangs ist es wichtig stets die Orientierung des Objektträgers beizubehalten. Wird das Präparat um 180° gedreht und zeigt mit der falschen Seite nach unten zum Laserstrahl, kann der Betrachter dies schnell im mikroskopischen Bild erken-

nen, da im RM eine scharfe Darstellung der Strukturen nicht möglich ist. Das Bild wirkt stark verwaschen und es ist unmöglich einzelne Strukturen zu identifizieren (Abb. 28). Im FM ist keine Darstellung möglich, sodass das Bild vollständig schwarz angezeigt wird.

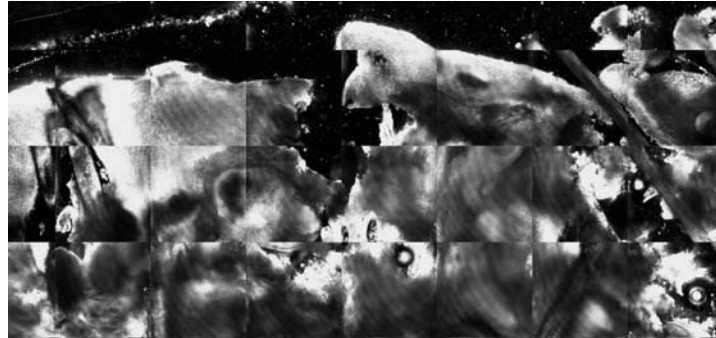
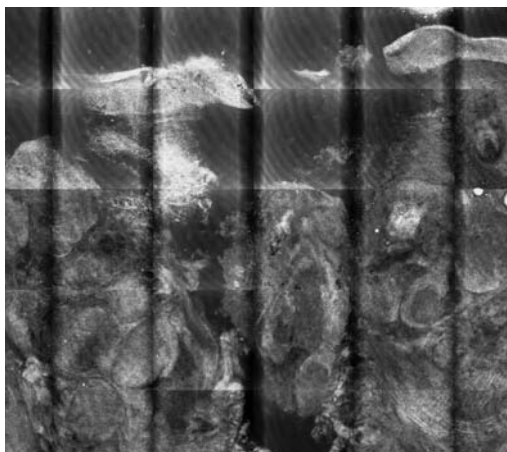


Abbildung 28: Ungefärbte Seite eines Präparats der gesunden Haut im RM. Färbung: Acridine Orange [Hartmann et al., 2015b]

Scannen ohne Ultraschallgel

Das Auftragen des Ultraschallgels auf die Unterseite des Objektträgers stellt eine Notwendigkeit für die Optimierung der numerischen Apertur dar. Wird dieser Schritt nicht durchgeführt, ist die Folge ein unscharfes, trübes Bild im RM. Das gesamte Bild wirkt verschwommen und besitzt eine sandkornartige Struktur (Abb. 29a). Im FM erscheint das Bild vollkommen schwarz mit Ausnahme einiger dunkelgrauer, undefinierbarer Strukturen (Abb. 29b).



(a) Reflexions-Modus

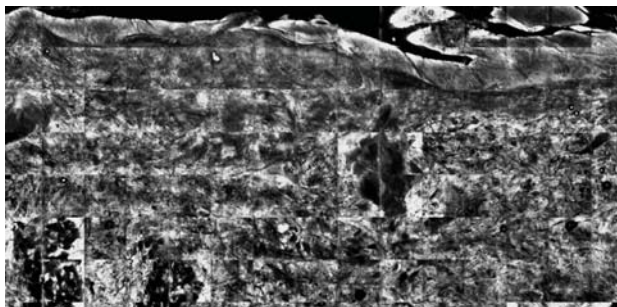


(b) Fluoreszenz-Modus

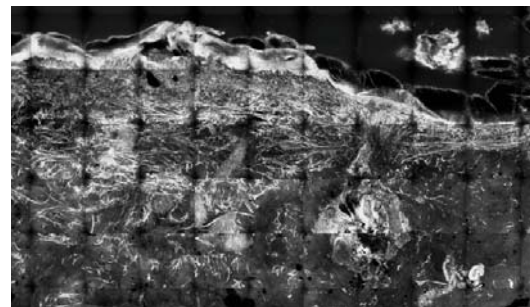
Abbildung 29: Ohne Ultraschallgel gescanntes Präparat der gesunden Haut. Färbung: Acridine Orange

Dicke des Präparats

Beim Schneiden des Gewebes sollte darauf geachtet werden eine möglichst schmale Präparatscheibe zu gewinnen. Ein sehr dick geschnittenes Präparat lässt sich im Mikroskop nicht scharf darstellen. Das gesamte Bild wirkt verwaschen (Abb. 30). Ab einer bestimmten Stärke ist es nicht mehr möglich das Präparat in die Haltevorrichtung des Mikroskops einzuspannen. Der Hersteller des Mikroskops empfiehlt eine maximale Dicke von 5mm.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

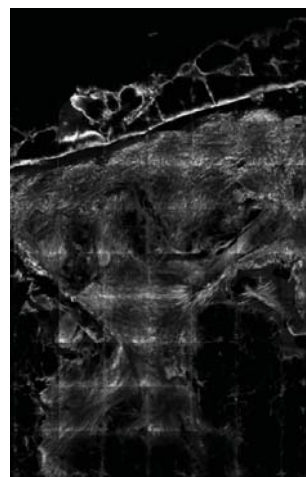
Abbildung 30: Zu dickes Präparat der gesunden Haut. Färbung: Acridine Orange

Präparat in Formalin

Wird das Präparat vor dem Färbe- und Scanvorgang in Formalin eingelegt, ist die Qualität des Bilds im FM sehr stark vermindert. Außerdem ist die Intensität der Fluoreszenz deutlich geringer (Abb. 31b). Das Bild im RM wird durch Formalin nicht beeinflusst (Abb. 31a).



(a) Reflexions-Modus

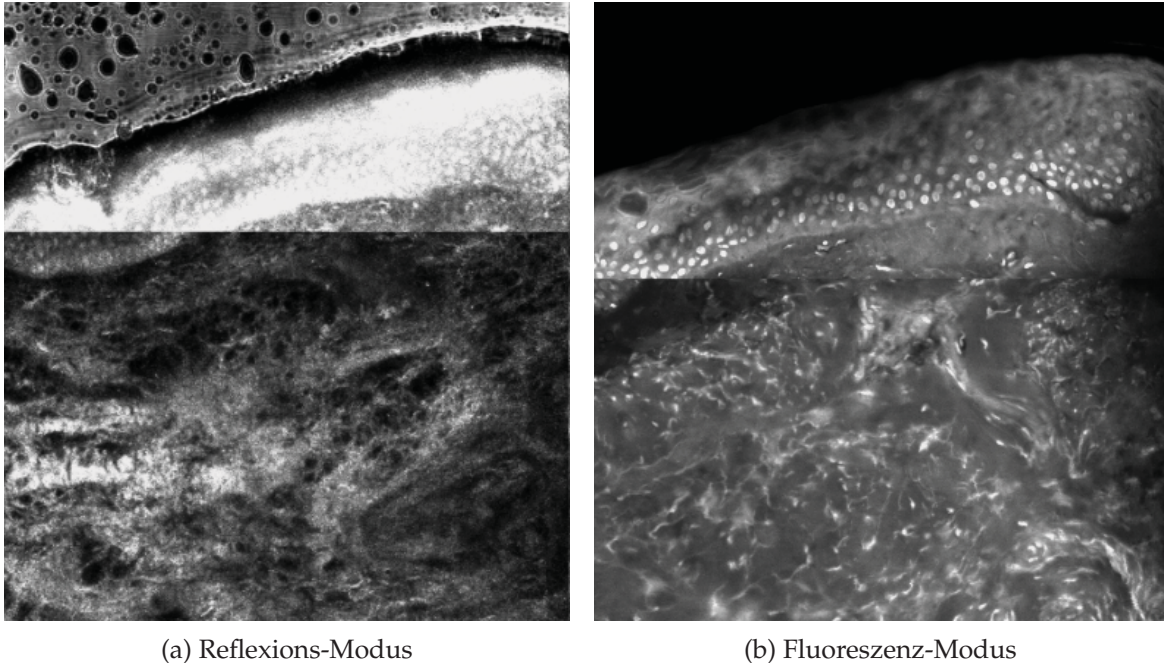


(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 31: Präparat der gesunden Haut in Formalin. Färbung: Acridine Orange

Gefrorenes Präparat

Ist es nicht möglich die frisch exziierten Präparate direkt am Operationstag zu untersuchen, werden sie zunächst eingefroren und zum nächstmöglichen Untersuchungszeitpunkt aufgetaut. Das weitere Vorgehen unterscheidet sich nicht vom standardisierten Ablauf. Die Qualität der Bilder der aufgetauten Präparate ist im RM durch einen verminderten Kontrast und eine verminderte Bildschärfe geringer als die der frischen Präparate (Abb. 32a). Im FM konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 32b)



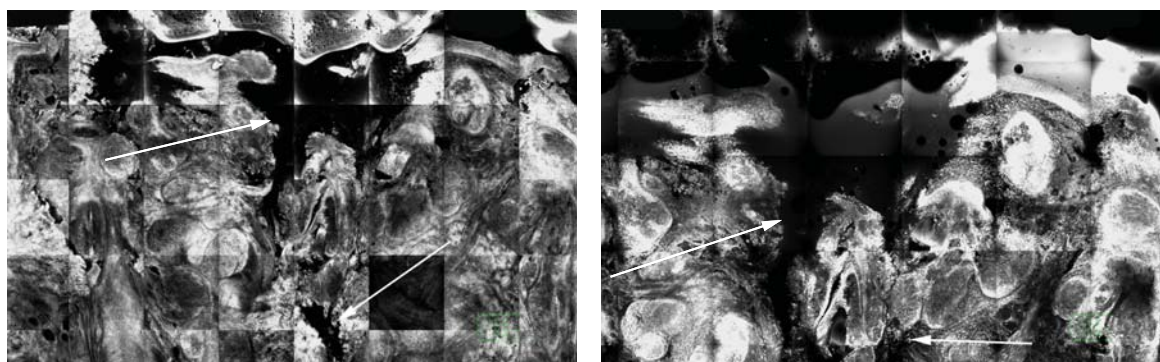
(a) Reflexions-Modus

(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 32: Präparat der gesunden Haut, das am Operationstag eingefroren und am Folgetag aufgetaut wurde. Färbung: Acridine Orange

Ausgetrocknetes Präparat

Das Austrocknen eines Präparats kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist ein Verdampfen der Flüssigkeit möglich wenn das Präparat zu lange untersucht und gescannt wird. Zum anderen trocknet das Präparat aus, wenn es im Mikroskop belassen wird und der Untersucher den Laser nicht ausschaltet. Die Ursache liegt in beiden Fällen in der hohen Wärmeentwicklung des Lasers. Die Konsequenz ist, dass sowohl der Fluoreszenzfarbstoff, als auch die Gewebeflüssigkeit verdampfen. Das mikroskopische Bild verliert deutlich an Qualität, da es unscharf wirkt und Spalten entstehen (Pfeile) deren Ursache in der Schrumpfung des Gewebes liegt (Abb. 33).



(a) Reflexions-Modus

(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 33: Ausgetrocknetes Präparat der gesunden Haut mit sichtbarer Spaltbildung.
Färbung: Acridine Orange

Häufigkeit des Auftretens der Artefakte

Die folgende Tabelle 5 zeigt mögliche Artefakte, ihre Ursachen, sowie die Maßnahmen, durch welche sie verhindert werden können. Außerdem zeigt die Tabelle die prozentualen Häufigkeiten ihres Auftretens in unserer Studie.

Artefakt	Ursache	Lösung	Anzahl innerhalb von 50 Präparaten	Prozent innerhalb von 50 Präparaten	Prozent an allen Artefakten
Dunkle, scharf begrenzte Lakunen mit weiß gesprenkeltem Zentrum	Silikon auf dem Gewebe	Vorsichtiges Umgehen mit der Silikonflasche während der Fixierung	2/50	4%	9%
Zahlreiche weiße Punkte, sternenhimmelartig am Präparatrand	Zu große Menge Silikon an den Rändern des Objektträgers	Verwendung von sehr kleinen Mengen Silikon zur Fixierung der beiden Objektträger	3/50	6%	13%
Weißer, ineinander verflochtene stäbchenförmige Strukturen	Fasern der Kompresse auf dem Präparat	Schneiden des Gewebes auf einer festen Unterlage anstelle der Kompresse	5/50	10%	23%

Verschwommene, kontrastarme Darstellung des Gewebes im RM, schwarze Aufnahme im FM	Scannen der ungefärbten Seite des Präparats	Markierung des Objektträgers	1/50	2%	5%
Verschwommene, kontrastarme Darstellung des Gewebes	Zu wenig oder kein Ultraschallgel	Verwendung von einer größeren Menge an Ultraschallgel bei langer Scanzeit zur Vermeidung der Austrocknung des Gewebes	2/50	4%	9%
Unscharfe, verschwommene Aufnahmen	Präparatscheibe zu dick geschnitten	Schneiden von dünnen Gewebescheiben mit einer Dicke von maximal 0,5cm	6/50	12%	27%
Im FM kann das Gewebe nicht dargestellt werden und zeigt ein schwarzes Bild	Präparat wurde in Formalin eingelegt	Einlegen des Gewebes vor dem Scanvorgang ausschließlich in NaCl	1/50	2%	5%
Verminderte Qualität der Aufnahme, dunkle Spalten innerhalb des Präparats durch Gewebeschrumpfung	Ausgetrocknetes Präparat	Minimierung der Vorbereitungszeit des Präparats und Ausschalten des Lasers während Pausen	2/50	4%	9%

Tabelle 5: Ursachen und Lösungsmöglichkeiten für das Auftreten von Artefakten, sowie die Häufigkeit ihres Vorkommens in Zahlen und Prozent. (Überarbeitet nach [Hartmann et al., 2015b])

5.4 Aufnahmen benigner Hautveränderungen in der KLM

5.4.1 Virusassoziierte Hautveränderungen

Verruca vulgaris

Abbildung 34 zeigt das Präparat einer *Verruca vulgaris*, welche die typischen histologischen Eigenschaften zeigt. Die Akanthose und Papillomatose (Pfeil) mit Ausziehung der Reteleisten sind deutlich sichtbar. Die Papillen sind zum Zentrum der Läsion ausgerichtet. Auch die zerklüftete Oberfläche und die Hyperkeratose (Pfeilspitze) unterstützen die Diagnose einer Verruca vulgaris.

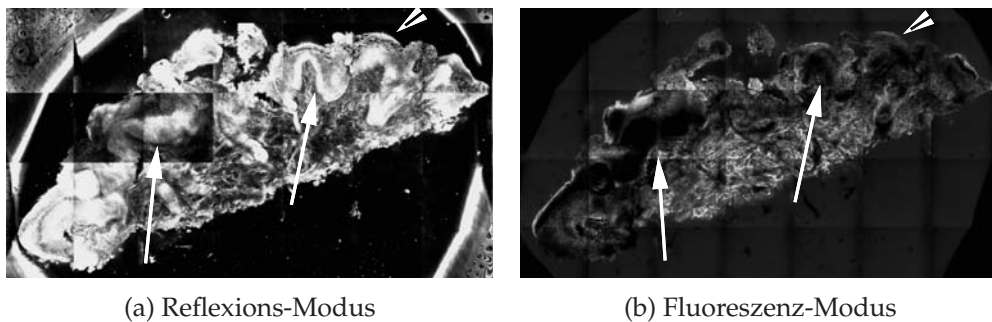


Abbildung 34: Übersichtsaufnahme einer Verruca vulgaris. Färbung: Acridine Orange

In Abbildung 35 die einen vergrößerten Ausschnitt des Präparats der Abb. 34 zeigt, sind die verlängerten Reteleisten und die hohen, kirchturnartigen Papillen des *Stratum papillare* der Dermis gut zu beurteilen. Die Parakeratose (Pfeilspitze) über den Spitzen der Papillen ist besonders deutlich im FM durch die hellen Kerne in der Hornschicht zu erkennen. Ebenso lassen sich vereinzelt die, für diese Läsion charakteristischen Koilozyten (kurzer Pfeil) finden. Die für die Verruca vulgaris typischen Kapillaren in den Papillenspitzen sind hier im RM als quer angeschnittene Gefäße zu sehen (langer Pfeil)

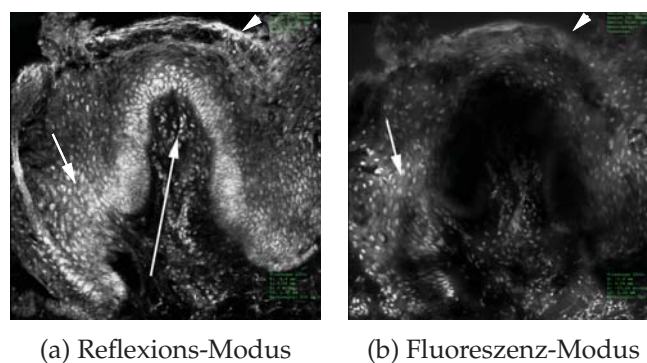
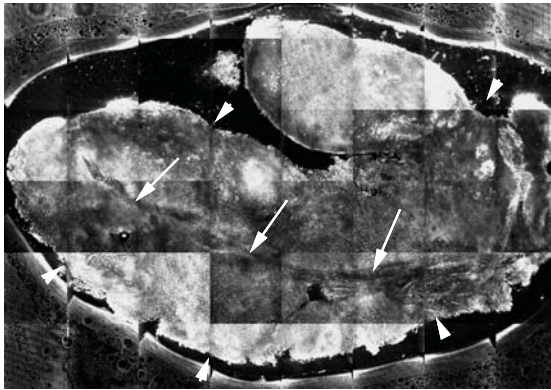


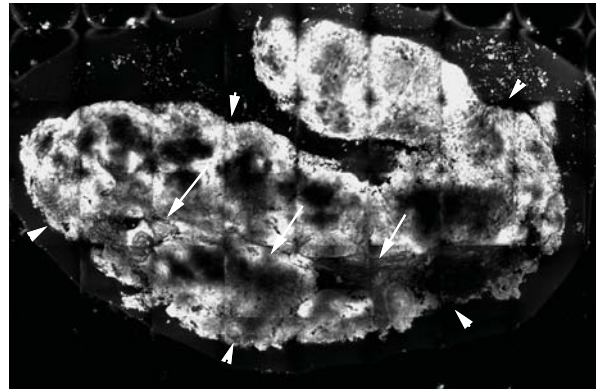
Abbildung 35: Dermale Papillen einer Verruca vulgaris. Färbung: Acridine Orange

Condyloma acuminatum

Die Übersichtsaufnahme eines Kondyloms ist in Abbildung 36 dargestellt. Das Präparat ist ein Querschnitt einer kugelförmigen Läsion. Zentral befindet sich ein sehr schmaler Streifen aus Bindegewebsstroma (Pfeile) der von einem sehr breiten hyperplastischen Epithel (Pfeilspitzen) umgeben ist. Die Epidermis ist akanthotisch und papillomatös, besitzt aber keine Hyperkeratose. Im RM zeigt sich die Epidermis mittelgrau, im FM leuchtet sie weiß.



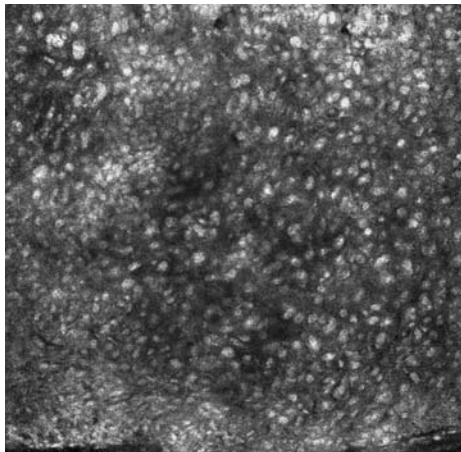
(a) Reflexions-Modus



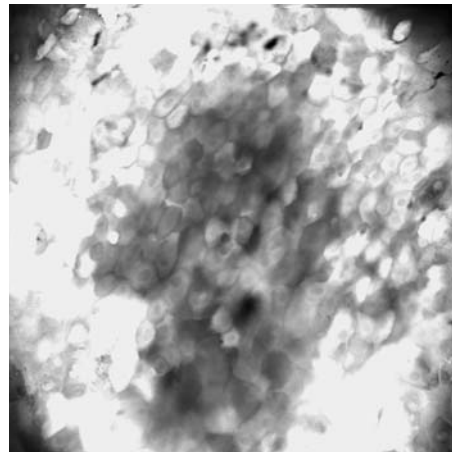
(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 36: Übersichtsaufnahme eines Kondyloms. Färbung: Acridine Orange

Abbildung 37 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus der Epidermis. Im RM wird deutlich, dass die weißen Zellkerne leicht variable Größen besitzen. Im FM leuchten die vergrößerten Keratinozyten hell weiß. Die Zellgrenzen sind gut zu erkennen.



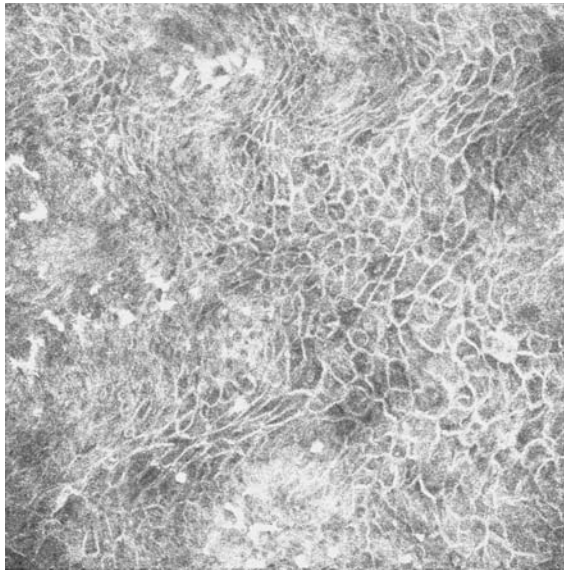
(a) Reflexions-Modus



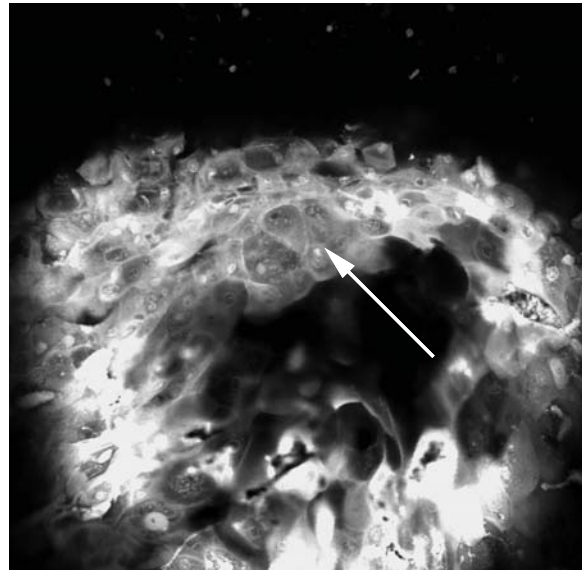
(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 37: Ausschnitt der Epidermis eines Kondyloms. Färbung: Acridine Orange

Koilozyten treten bei den Kondylomen seltener als bei den Dellwarzen auf. In Abb. 38a ist die Epidermis im RM zu sehen. Die Zellen sind sehr groß und besitzen sehr breite Zellmembranen. Die Formen der einzelnen Zellen sind variabel. Im FM sind die Koilozyten (Pfeil) besonders deutlich zu erkennen. Die virusgefüllten Keratinozyten sind vergrößert und besitzen einen hellen Kern.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 38: Koilozyten eines Kondyloms. Färbung: Acridine Orange

Molluscum contagiosum

Das *Molluscum contagiosum* aus Abbildung 39 stellt sich als ein halbkugeliges Knötchen (Pfeil) dar, das scharf abgegrenzt ist. Das Knötchen ist in mehrere, relativ gleich große, ovale Läppchen unterteilt die durch Epithelproliferationen gebildet werden. Sie sind durch Bindegewebssepten voneinander getrennt. Sowohl im RM als auch im FM erscheint das Knötchen hellgrau bis weiß und relativ homogen mit einer körnigen Textur. Oberhalb des Knötchens befindet sich eine lockere Masse aus Zelldetritus (Pfeilspitze). Im RM besitzt sie eine mittelgraue Farbe während im FM die einzelnen punktförmigen Strukturen weiß leuchten.

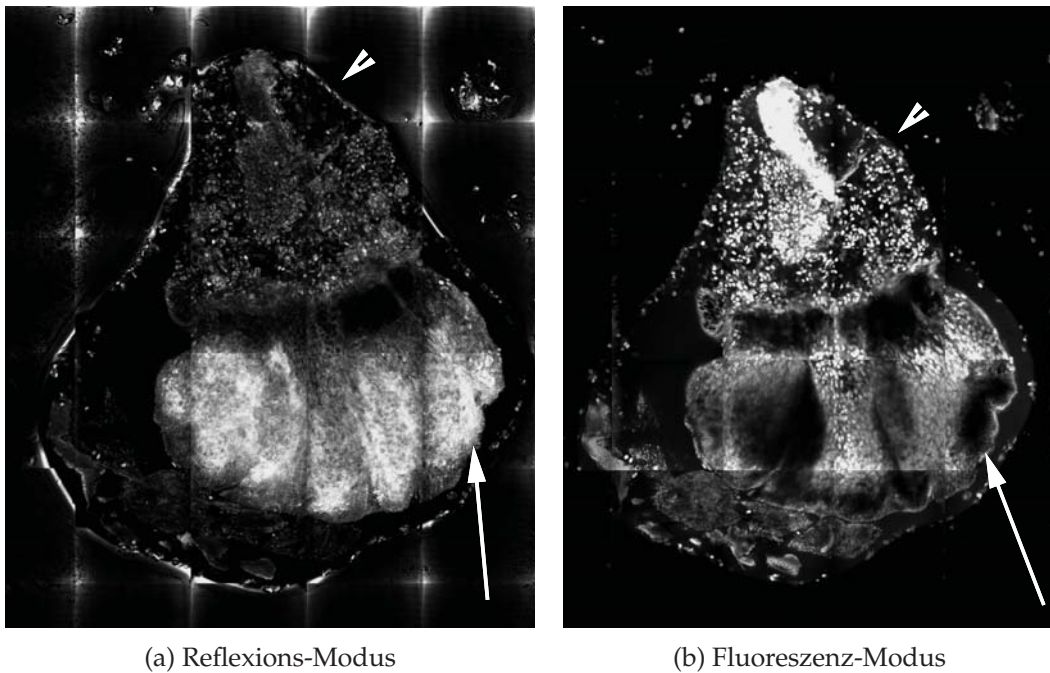


Abbildung 39: Übersichtsaufnahme eines Molluscum contagiosum. Färbung: Acridine Orange

In Abbildung 40 ist das Knötchen vergrößert dargestellt. Die einzelnen ovalen Läppchen (Pfeilspitzen) sind parallel angeordnet. Die Bindegewebssepten (Pfeile) lassen sich im RM leichter erkennen als im FM. Es zeigt sich eine homogene Masse aus Epithelzellen und Molluscum-Körperchen.

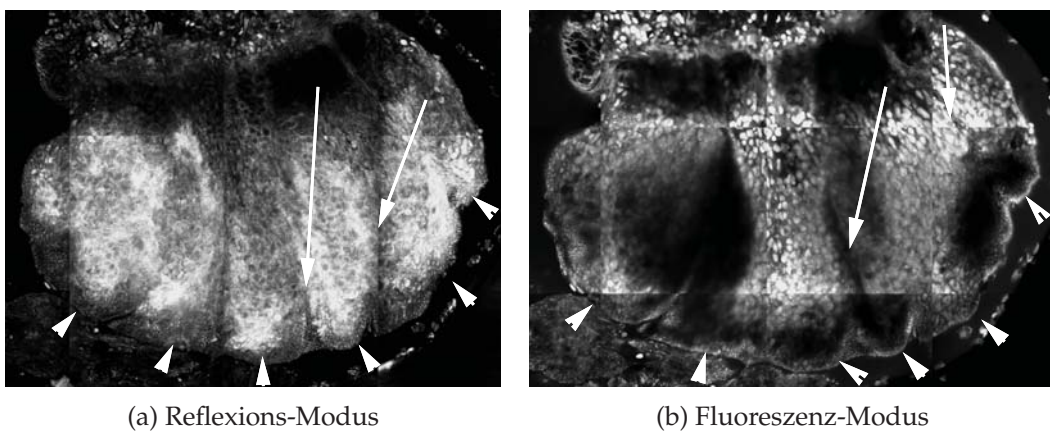
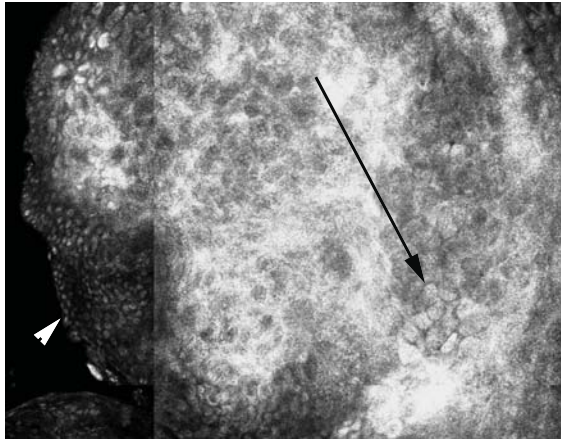
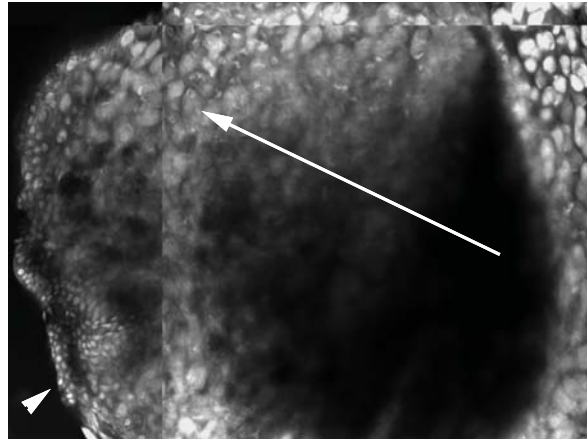


Abbildung 40: Ausschnitt eines Molluscum contagiosum. Färbung: Acridine Orange

Eine noch stärkere Vergrößerung des Knötchens zeigt Abbildung 41. Hier kann man die stark vergrößerten, virenhaltigen Zellen sehr gut erkennen. Am Rand des Präparats sind die Epithelzellen (Pfeilspitze) sehr klein, während die virenbefallenen Zellen (Pfeil) im Zentrum der Lämpchen fast achtmal größer sind.



(a) Reflexions-Modus



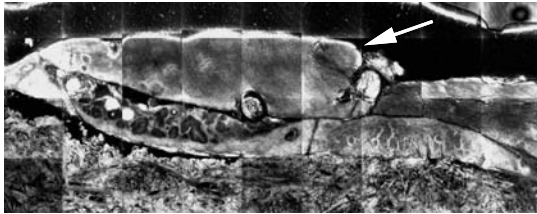
(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 41: Stark vergrößerter Ausschnitt eines Molluscum contagiosum. Färbung: Acridine Orange

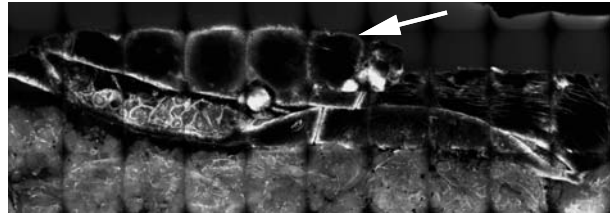
5.4.2 Benigne nicht-melanozytäre Hautveränderungen

Verruca seborrhoica

Abbildungung 42 zeigt das charakteristische Bild einer *Verruca seborrhoica*. Die Hyperkeratose (Pfeil) ist im RM aufgrund ihrer homogenen, grauen Struktur deutlich zu sehen. Im FM ist diese Eigenschaft nicht gut zu beurteilen, da die kernlosen Keratinozyten schwarz erscheinen. In beiden Modi lassen sich die Akanthose und Papillomatose zeigen. Die Grenze zur unauffälligen Dermis verläuft scharf.



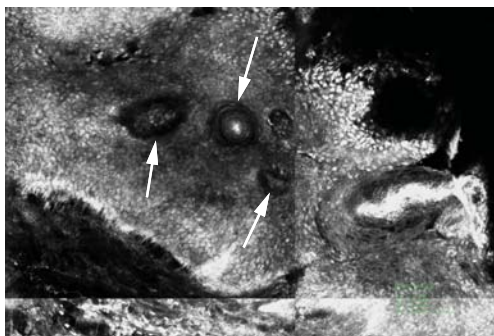
(a) Reflexions-Modus



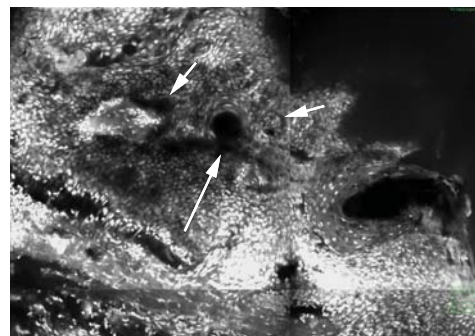
(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildungung 42: Übersichtsaufnahme einer *Verruca seborrhoica*. Färbung: Acridine Orange

In Abbildung 43 ist ein Areal einer pigmentierten *Verruca seborrhoica* vergrößert dargestellt. Hier können die Pseudohornzysten (Pfeile) besonders gut beobachtet werden. Im RM bilden die hellgrauen Keratinozyten der Epidermis einen runden bis ovalen, leicht unregelmäßigen Ring der einen dunkelgrauen Raum mit körniger Struktur umgibt. Bei einigen Pseudohornzysten erscheint zentral ein weißer Kreis der konzentrisch von grauen Ringen umgeben wird. Im FM ist die Grenze der homogenen Pseudohornzyste zur weiß leuchtenden Epidermis weniger scharf. Die Farbe des Lumens ist variabel und reicht von weiß bis schwarz. Dass es sich um eine pigmentierte Läsion handelt, kann an dem hellen Leuchten des gesamten Präparats erkannt werden. Grund dafür ist die erhöhte Anzahl an weiß erscheinenden Melanozyten.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildungung 43: Epidermis einer *Verruca seborrhoica*. Färbung: Acridine Orange

Abbildung 44 zeigt einen ähnlichen Ausschnitt einer *Verruca seborrhoica*, in welchem die Epithelhyperplasie zu beobachten ist. In die Epidermis sind zahlreiche Pseudohornzysten unterschiedlicher Größe eingebettet.

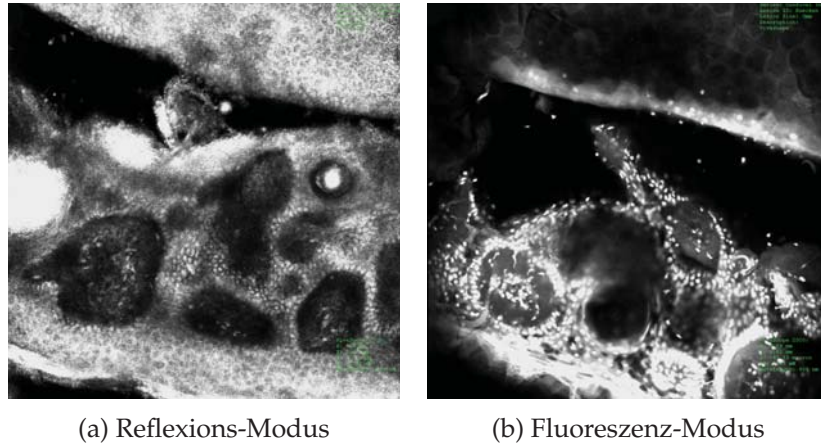


Abbildung 44: Epithelhyperplasie einer *Verruca seborrhoica*. Färbung: Acridine Orange

Ein weiteres typisches Merkmal der *Verruca seborrhoica* ist in dem Präparat aus Abbildung 45 zu beobachten. Die hyperkeratotische Masse aus zwei Pseudohornzysten (Pfeil) die der Epidermis pilzartig aufgelagert ist, wird im RM und FM scharf abgebildet und hat eine leuchtend weiße Farbe. Sie entspringt aus tief in der akanthotischen Epidermis gelegenen Pseudohornzysten und endet an der Oberfläche in unscharfen, flaggenartigen Ausläufern.

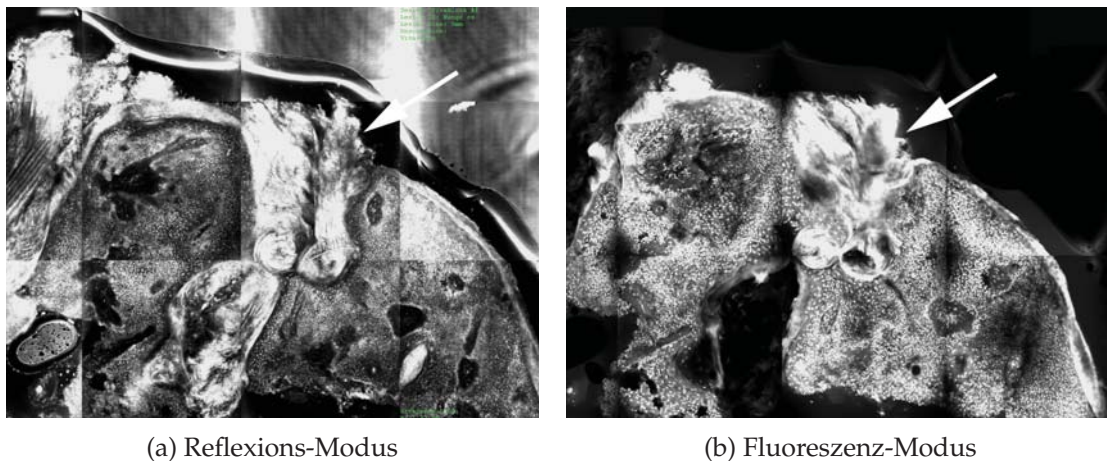


Abbildung 45: Keratinmassen der Pseudohornzysten einer *Verruca seborrhoica*. Färbung: Acridine Orange

Cicatrix

Wie Abbildung 46 zeigt, weist die Dermis einer vernarbten Haut im Gegensatz zur der Dermis der gesunden Haut gewisse Unterschiede auf. Die Epidermis zeigt keine Veränderungen im Vergleich zu der Epidermis einer gesunden Haut. In der Dermis sind die kollagenen Fasern stark vermehrt, während die elastischen Fasern vollständig fehlen. Die Anordnung der kollagenen Fasern ist nicht mehr netzförmig verzweigt, sondern strangartig und parallel zur Hautoberfläche (Pfeil). Talgdrüsen und Haarfollikel fehlen.

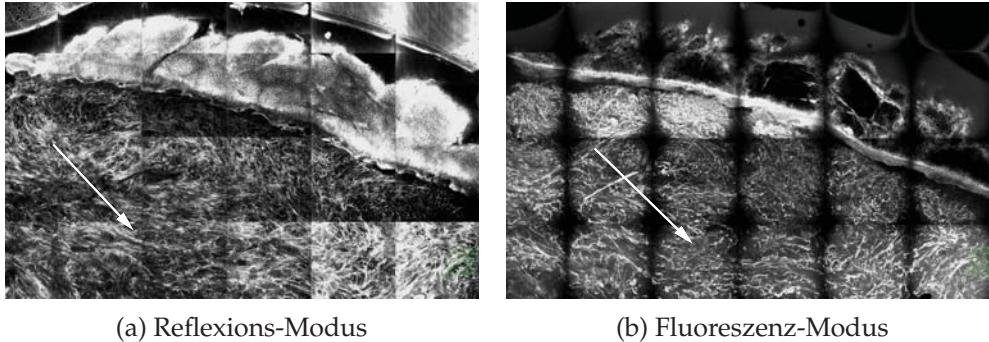


Abbildung 46: Übersichtsaufnahme einer Narbe. Färbung: Acridine Orange

Abbildung 47 zeigt das Präparat einer Läsion der *Akne inversa*, die stark vernarbt ist. Hier ist der Übergang (Pfeil) von Narbengewebe (linke Bildhälfte) zu gesunder Haut (rechte Bildhälfte) zu beobachten. Im RM scheint das Narbengewebe hellgrau bis mittelgrau und wirkt sehr homogen. In der Dermis der gesunden Haut zeigt sich das netzförmige Muster der kollagenen Fasern, die teilweise weiß erscheinen. Im FM ist besonders auffällig, dass das Narbengewebe im Vergleich zur gesunden Dermis viel dunkler ist und nur sehr wenig helle Strukturen aufweist. In der gesunden Dermis lassen sich zahlreiche weiße, netzförmig verflochtene Fasern erkennen.

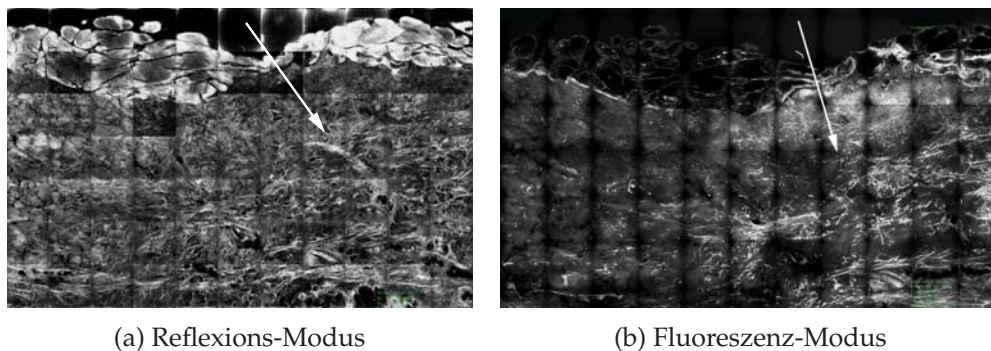


Abbildung 47: Übergang von Narbengewebe zur gesunden Haut bei der Akne inversa. Färbung: Acridine Orange

In Abbildung 48 wird aus dem Präparat der Akne inversa ein Ausschnitt aus der vernarbten Dermis gezeigt. Im RM erkennt man deutlich die gebündelten, parallel angeordneten, hellgrauen bis mittelgrauen Kollagenfasern. Im FM wirken die Bündel sehr homogen mittelgrau. Einzelne, hell leuchtende Fasern sind zu erkennen.

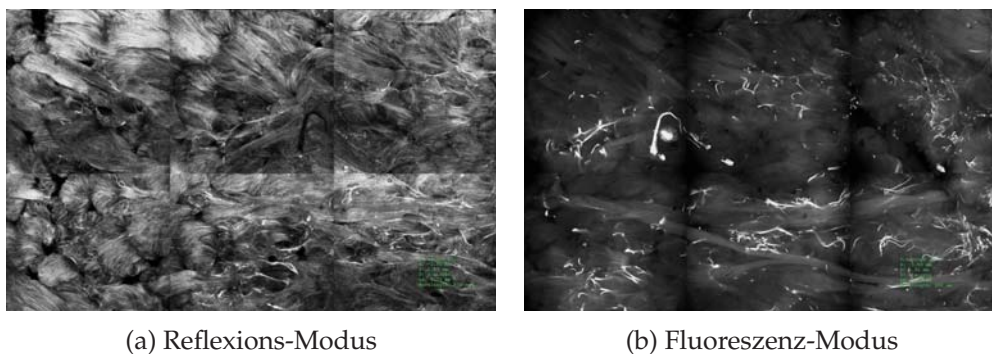


Abbildung 48: Narbengewebe der Akne inversa. Färbung: Acridine Orange

Lipom

Die Aufnahmen des Lipoms aus Abb. 49 unterscheiden sich im RM und FM sehr stark. Die Übersichtsaufnahme im RM zeigt ein unregelmäßiges Muster aus schwarz und weiß erscheinenden Fettgewebszellen. Der Grenzen des Tumors sind deutlich zu erkennen. Im FM kann das Präparat in der Übersichtsaufnahme kaum beurteilt werden, da die Fettzellen schwarz erscheinen. Die hellen Zellkerne und Zellmembranen sind hier nicht zu erkennen.

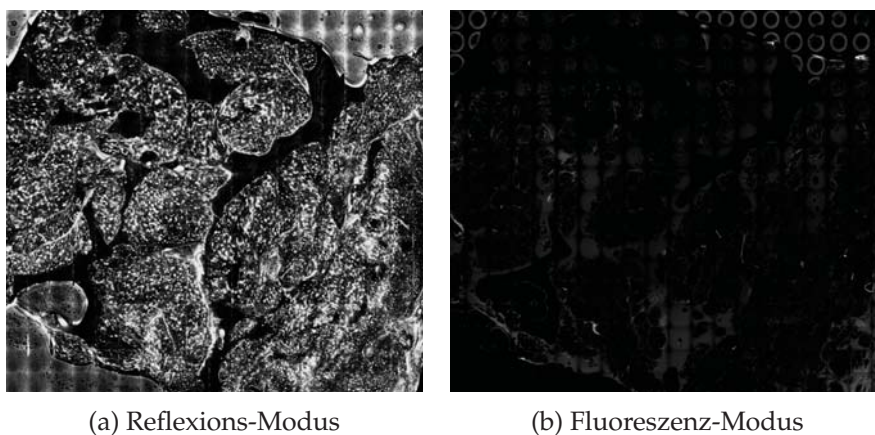


Abbildung 49: Übersichtsaufnahme eines Lipoms. Färbung: Acridine Orange

Der Ausschnitt des Lipoms in vergrößerter Ansicht aus Abbildung 50 zeigt im RM sehr deutlich die Grenzen der einzelnen Fettgewebszellen. Die Zellen zeigen keine Anzeichen

von Atypie und ihre Größe ist sehr ähnlich. Die Zellform ist polyedrisch, wodurch ein Wabenmuster entsteht. Die Farbe der einzelnen Zellen ist jedoch unterschiedlich, weiß, mittelgrau, dunkelgrau und schwarz. Die Zellkerne sind nicht zu erkennen. Im FM sind die mit Fett gefüllten Zellen schwarz und sehr schlecht zu differenzieren. Ihre Membranen (kurzer Pfeil) leuchten hellgrau, aber sind nur in wenigen Bereichen zu erkennen. Die peripheren Zellkerne (langer Pfeil) sind weiß und bilden einen starken Kontrast. Im oberen Teil des Bildes ist ein Blutgefäß (Pfeilspitze) quer angeschnitten.

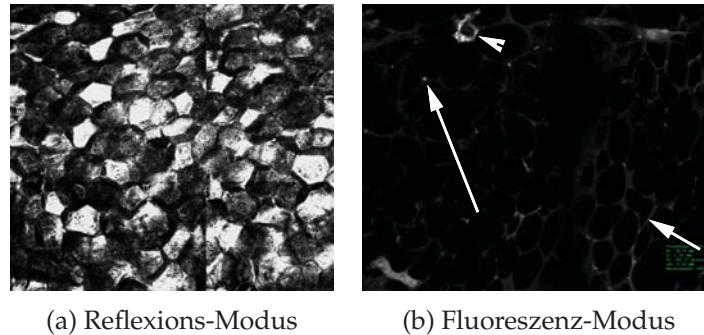


Abbildung 50: Fettzellen eines Lipoms. Färbung: Acridine Orange

Fibroma molle

Abbildung 51 zeigt eine Scheibe aus einem kugelförmigen *Fibroma molle*. Die unauffällige Epidermis (Pfeile) ist im RM weiß, im FM aufgrund ihres schwarzen Erscheinungsbildes kaum zu erkennen. Der innere Raum, der von der Epidermis umgeben wird, besteht aus Bindegewebe.

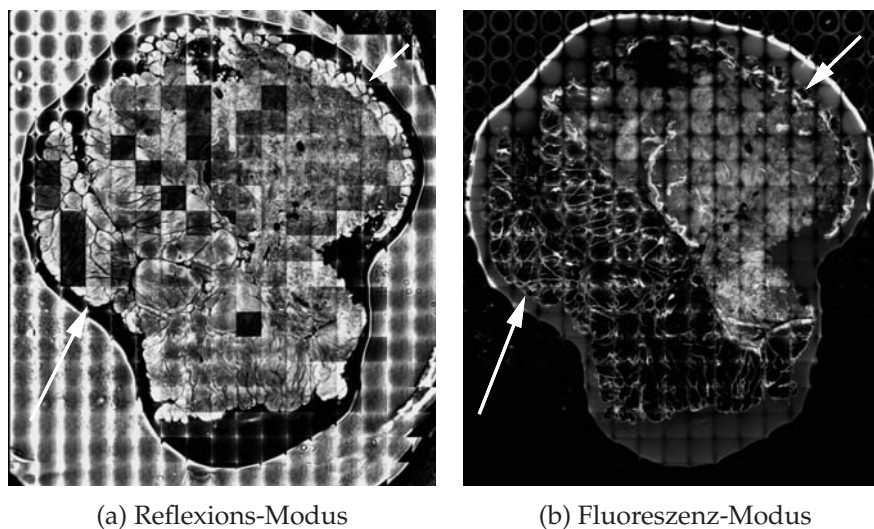
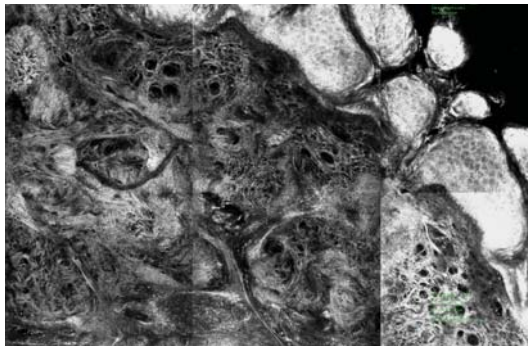
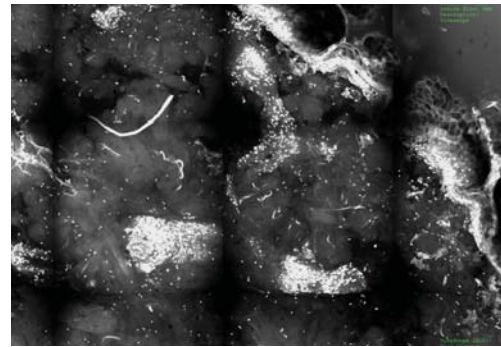


Abbildung 51: Übersichtsaufnahme eines Fibroma molle. Färbung: Acridine Orange

Ein vergrößerter Ausschnitt des *Fibroma molle* wird in Abbildung 52 dargestellt. Das lockere Bindegewebe ist im RM besonders deutlich abgebildet. Es zeigt faserartige Strukturen die ein hellgraues und mittelgraues netzartiges Geflecht ausbilden. Die Grenze zur weißen Epidermis ist scharf. Im FM ist das Bindegewebe homogen und eine Struktur zeichnet sich nur sehr weich ab. Einzelne, weiße Fasern und Zellen heben sich von ihrem mittelgrauen Untergrund ab.



(a) Reflexions-Modus

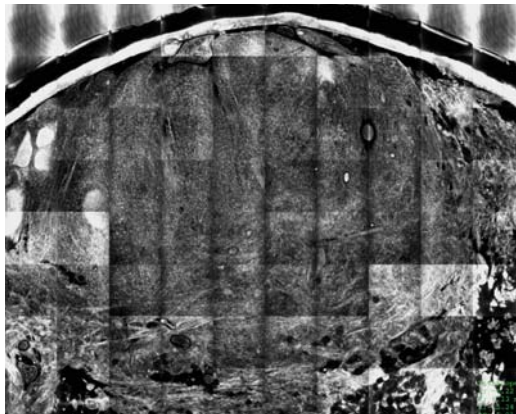


(b) Fluoreszenz-Modus

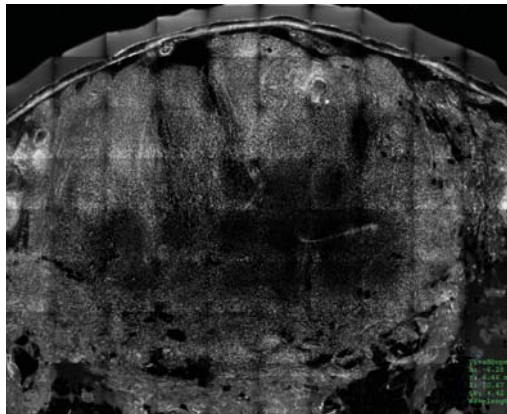
Abbildung 52: Ausschnitt eines Fibroma molle. Färbung: Acridine Orange

Neurofibrom

Ein dermales Neurofibrom wird in Abbildung 53 gezeigt. Die Epidermis (Pfeil) oberhalb der Veränderung ist intakt und unverändert. Der Tumor erscheint im RM und im FM mittelgrau und ist vom umliegenden Gewebe unscharf abgegrenzt. Die Struktur ist homogen und besitzt ein sandkornartiges Muster.



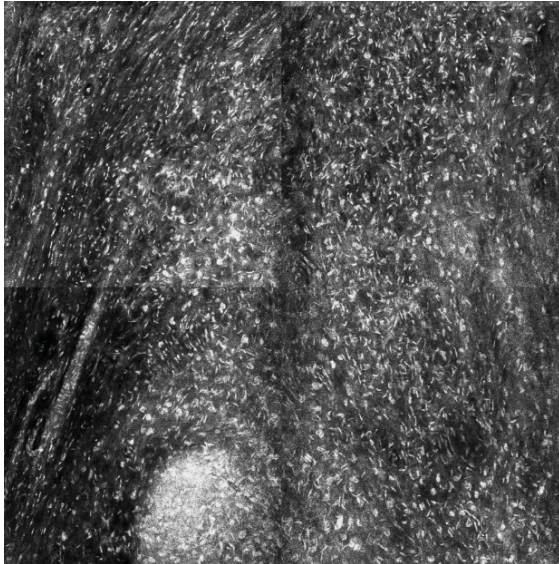
(a) Reflexions-Modus



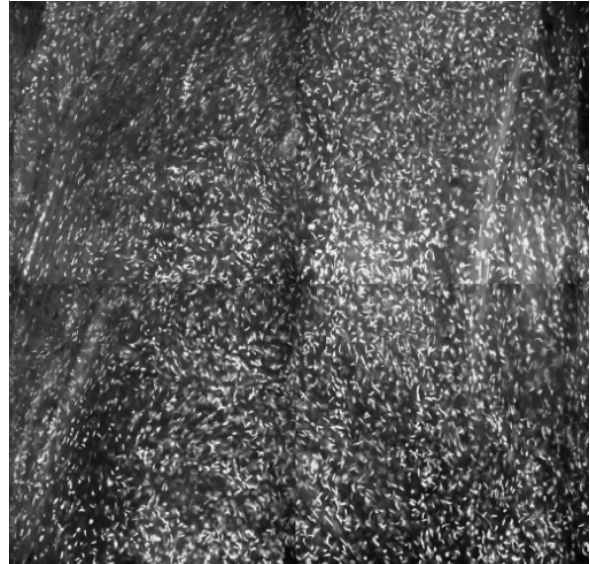
(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 53: Übersichtsaufnahme eines Neurofibroms. Färbung: Acridine Orange

Ein Ausschnitt des Neurofibroms wird in Abbildung 54 vergrößert gezeigt. Die Abbildung wirkt im RM und im FM fast identisch. Die zahlreichen, fadenförmigen Nervenfasern bilden eine homogene Struktur, die von unzähligen kommaartigen, weißen Zellen durchsetzt ist. Bei diesen Zellen handelt es sich um Fibroblasten.



(a) Reflexions-Modus



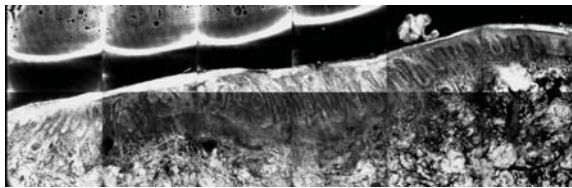
(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 54: Vergrößerter Ausschnitt eines Neurofibroms. Färbung: Acridine Orange

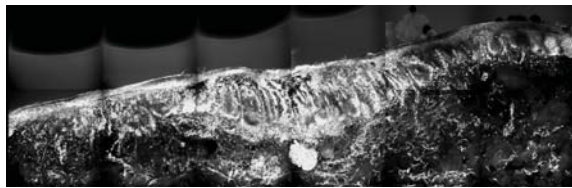
5.4.3 Melanozytäre Hautveränderungen

Nävus vom Junktionstyp

Abbildung 55 zeigt einen Nävus vom Junktionstyp. Der Aufbau der scharf begrenzten Läsion ist symmetrisch. Die gleichmäßigen, verlängerten Reteleisten reichen im zentralen Anteil der Läsion besonders weit in die Dermis, während sie zur Peripherie hin kontinuierlich kürzer werden. Die erhöhte Anzahl von Melanozyten hat ein weißes Leuchten der Epidermis zur Folge. Im FM ist der Kontrast zwischen der Epidermis, den melanozytären Nestern und der Dermis stärker als im RM.



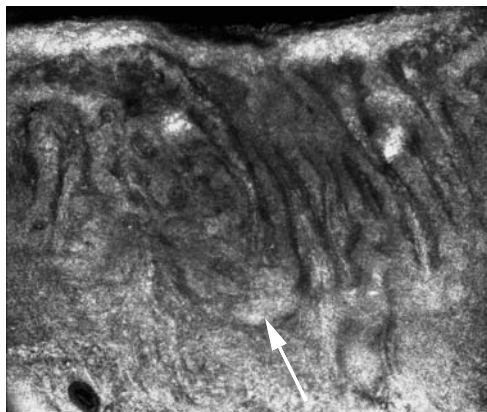
(a) Reflexions-Modus



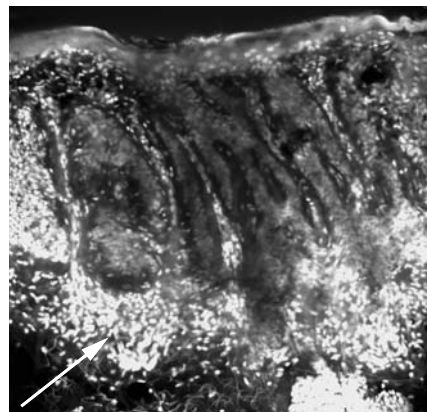
(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 55: Übersichtsaufnahme eines Nävus vom Junktionstyp. Färbung: Acridine Orange

Ein Ausschnitt der Epidermis aus dem Zentrum der Läsion wird in Abbildung 56 vergrößert dargestellt. Die Reteleisten sind gleichmäßig und zeigen keine horizontale Konfluenz. Vor allem im FM werden die junctionalen Nester (Pfeil) aus weiß leuchtenden Melanozyten stark hervorgehoben. Im RM erscheinen die Nester (Pfeil) hellgrau im Vergleich zur mittelgrauen Epidermis. Sie befinden sich ausschließlich im Bereich der DEJ.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 56: Epidermis und DEJ im zentralen Anteil eines Nävus vom Junktionstyp. Färbung: Acridine Orange

Abbildung 57 zeigt die periphere Zone des Nävus mit den kürzeren Reteleisten. Die Pigmenteinschlüsse (Pfeilspitze) im *Stratum corneum* der Epidermis leuchten im RM und FM weiß. Im RM zeigen sich vermehrt einzelne weiße Melanozyten im Stratum basale (Pfeil). Die weißen, monomorphen Melanozyten (Pfeil) heben sich im FM sehr stark von der dunkelgrauen Umgebung ab. Die Melanozyten zeigen keine Zell- und Kernpolymorphien und besitzen eine gleiche Form und Größe. In der Dermis lassen sich weder eine Fibrose, noch eine solare Elastose feststellen. Die kollagenen und elastischen Fasern erscheinen unauffällig. Spärliche lymphohistiozytäre Infiltrate sind nur in einzelnen Bereichen festzustellen.

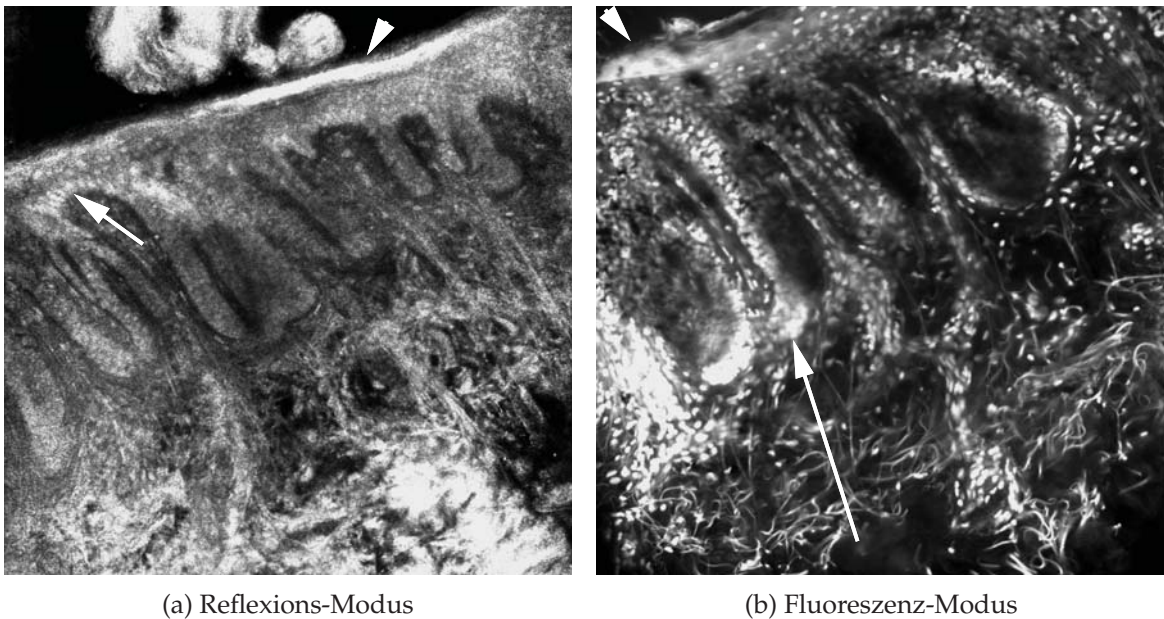
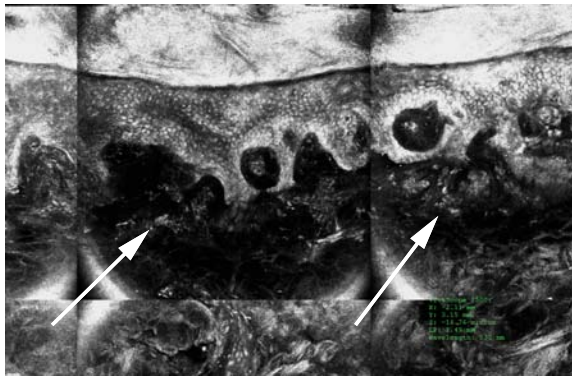


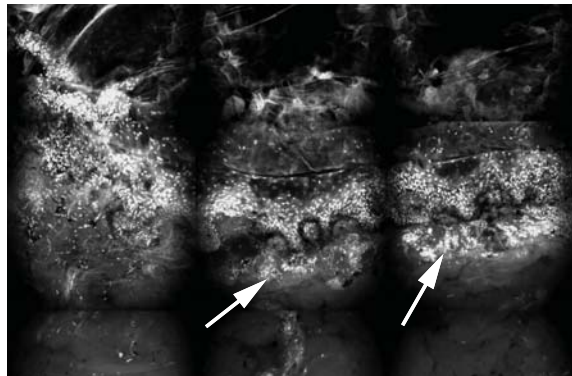
Abbildung 57: Epidermis und DEJ im peripheren Anteil eines Nävus vom Junctionstyp.
Färbung: Acridine Orange

Nävus vom Compoundtyp

Charakteristisch für den Nävus vom Compoundtyp ist das Auftreten von melanozytären Nestern sowohl in der DEJ, als auch in der Dermis. In der Aufnahme des Präparats aus Abb. 58 sind verlängerte Reteleisten zu erkennen. Im RM zeigt sich die Epidermis hellgrau mit einzelnen, weiß leuchtenden Bereichen, die einer vergrößerten Anzahl an Melanozyten entsprechen. Die dermalen Nester (Pfeil) sind mittelgrau und befinden sich im Bereich des oberen Koriums. Im FM leuchten sowohl die Epidermis als auch die melanozytären Nester (Pfeil) hell weiß. Eine genaue Unterscheidung zwischen Epidermis und melanozytären Nestern ist bei dieser Vergrößerung nicht möglich. Die Grenze zur homogenen, mittelgrauen unteren Dermis ist gut zu erkennen.



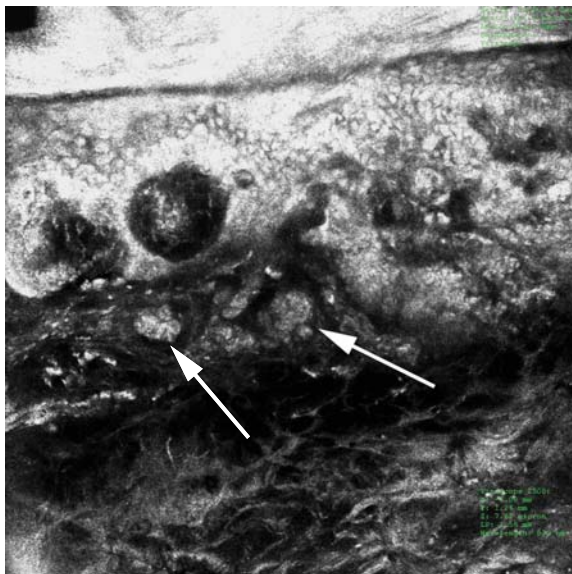
(a) Reflexions-Modus



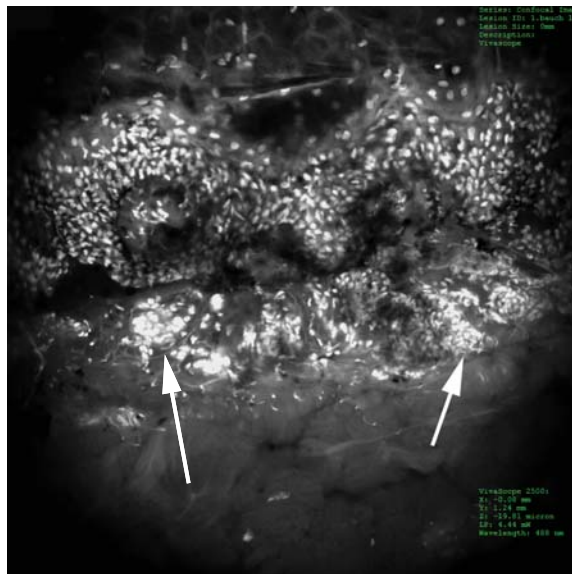
(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 58: Epidermis und Dermis eines Nävus vom Compoundtyp. Färbung: Acridine Orange

Abbildung 59 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt eines Nävus vom Compoundtyp. Die melanozytären Nester (Pfeile) leuchten sowohl im RM, als auch im FM weiß und sind klar abgegrenzt. Sie sind im Bereich der DEJ und des oberen Koriums lokalisiert. Während die Dermis in ihrer oberen Schicht von zahlreichen melanozytären Nestern durchsetzt ist, erscheint ihre untere Schicht vollkommen unauffällig.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 59: Epidermis und melanozytäre Nester eines Nävus vom Compoundtyp. Färbung: Acridine Orange

In der Aufnahme der Abb. 60 zeigt die Epidermis ein ringförmiges Muster, dessen Ursache im schrägen Anschnitt des Präparats liegt. Es können weiße Melanozyten in der DEJ und im Bereich des Koriurns (Pfeil) festgestellt werden

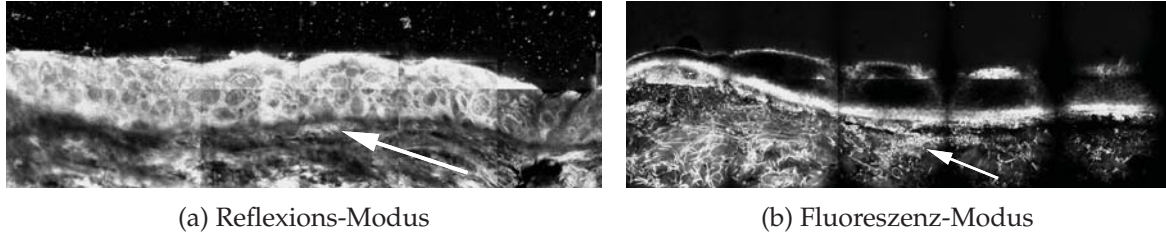


Abbildung 60: Übersichtsaufnahme eines Nävus vom Compoundtyp mit schräg angeschnittener Epidermis. Färbung: Acridine Orange

Die Aufnahmen aus Abb. 61 zeigen noch einmal eine schräg angeschnittene Epidermis. Die Ringe entsprechen den einzelnen Reteleisten der Epidermis. Die einzelnen weißen Zellen (Pfeilspitzen) eines solchen Zellrings sind die Melanozyten. Die Größe und Form, sowie die Helligkeitsstufe der einzelnen Melanozyten sind gleich. Ein symmetrischer Aufbau der Ringe wird als Merkmal für die Gutartigkeit einer Läsion angesehen.

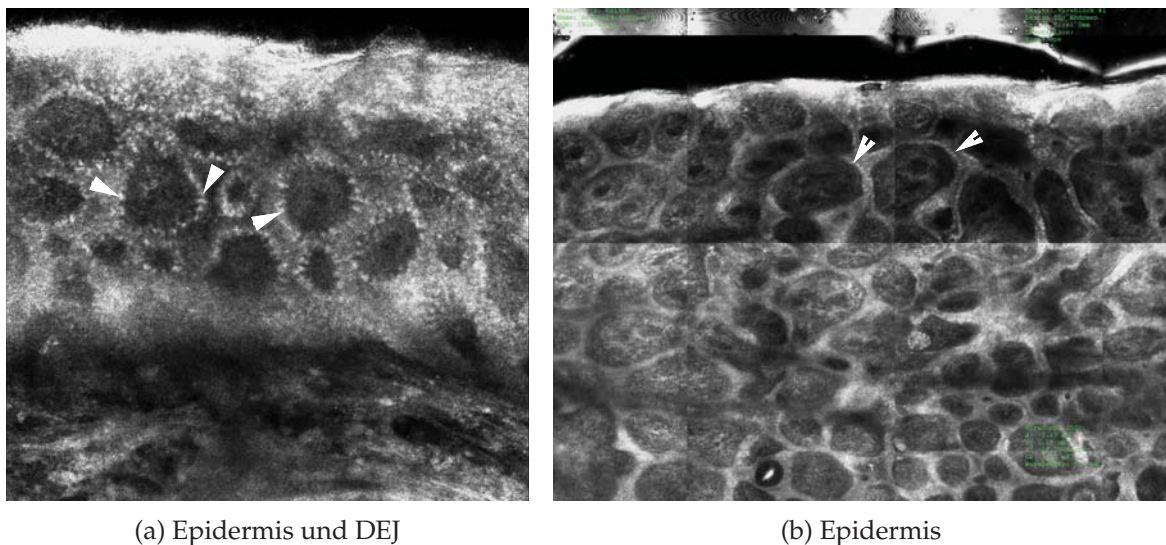
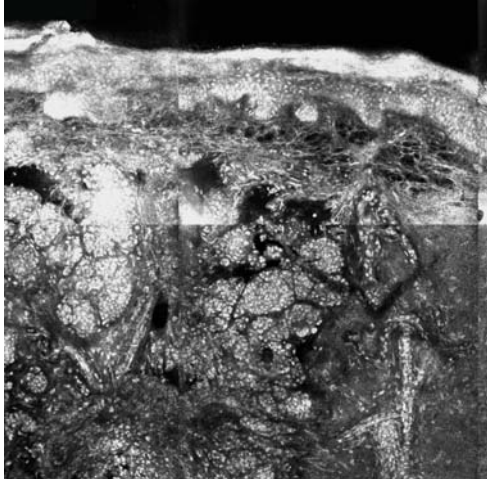


Abbildung 61: Schräg angeschnittene Epidermis eines Nävus vom Compoundtyp. Färbung: Acridine Orange

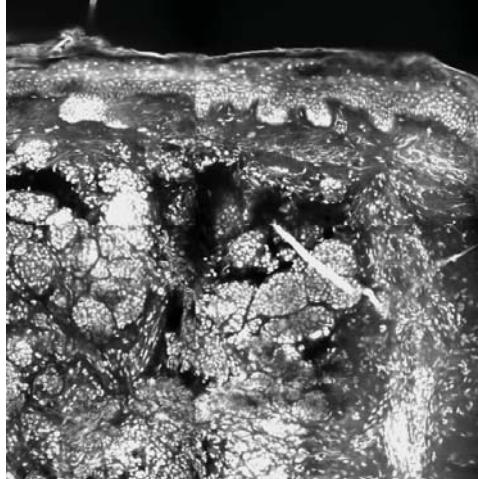
Dermaler Nävus

Die Nester der dermalen Nävi sind ausschließlich in der Dermis lokalisiert, während die Epidermis frei von melanozytären Nestern ist. Bei dem dermalen Nävus aus Abb. 62 sind

die melanozytären Nester um die Hautadnexa der Dermis gruppiert. Die runden und ovalen Zellaggregate sind scharf von ihrer Umgebung abgegrenzt und sind im RM und im FM weiß.



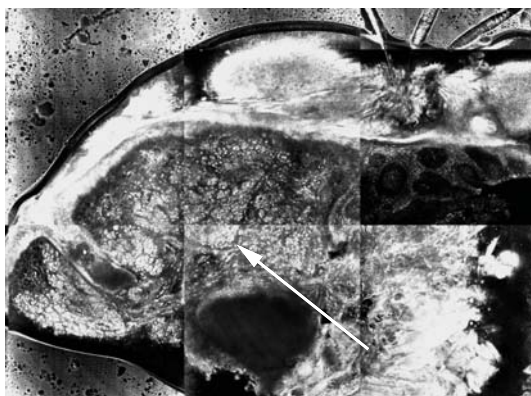
(a) Reflexions-Modus



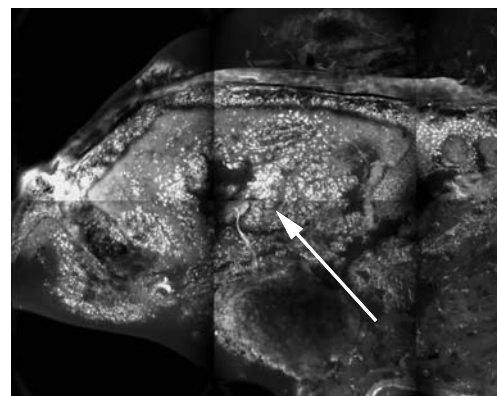
(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 62: Übersichtsaufnahme eines dermalen Nävus mit ausgeprägten melanozytären Nestern. Färbung: Acridine Orange [Hartmann et al., 2015a]

Die Nester (Pfeil) des dermalen Nävus aus Abb. 63 haben eine sehr deutliche Begrenzung. Im RM sind die melanozytären Nester weiß bis hellgrau und haben in der Übersichtsaufnahme ein körniges Aussehen. Innerhalb dieses Areals lässt sich ein Haarfollikel erkennen. Im FM ist das Areal des Nävus ebenfalls weiß bis hellgrau, wirkt jedoch homogener.



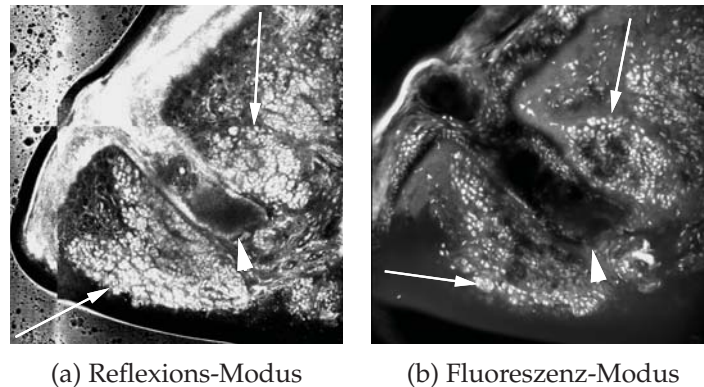
(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

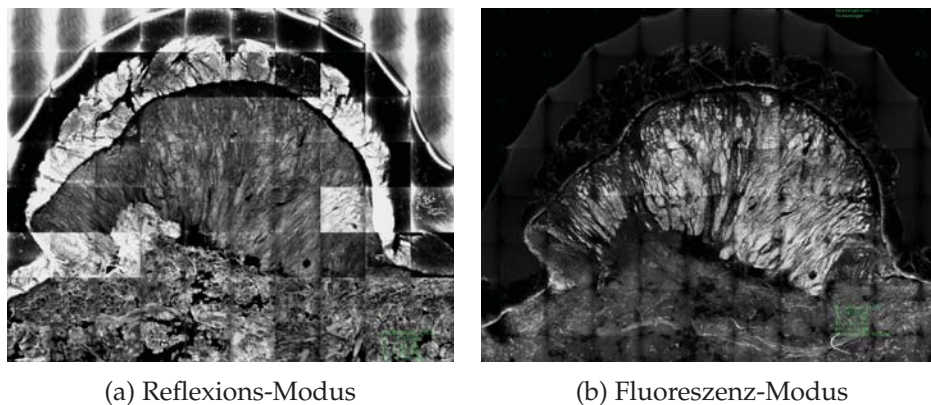
Abbildung 63: Übersichtsaufnahme eines dermalen Nävus. Färbung: Acridine Orange

Ein vergrößerter Ausschnitt dieses dermalen Nävus ist in Abb. 64 dargestellt. Die melanozytären Nester liegen dicht beisammen und umsäumen ein Haarfollikel (Pfeilspitze). Die Größe der einzelnen Melanozyten ist allgemein klein und unterscheidet sich kaum. Ihre Formen sind gleichmäßig und zeigen keine Atypien. Im RM ist die Abgrenzung der melanozytären Nester (Pfeile) schärfer zu ihrer Umgebung als im FM, jedoch ist der Kontrast zu ihrer Umgebung geringer als im FM. Im FM können auch einzelne Melanozyten in den oberen Dermissschichten erkannt werden.



Abbildungung 64: Melanozytäre Nester eines dermalen Nävus, welche einen Haarfollikel umgeben. Färbung: Acridine Orange

Abbildungung 65 zeigt einen papillomatösen dermalen Nävus. Die Läsion ist symmetrisch, halbkugelig aufgebaut und besitzt sowohl seitlich als auch in der Tiefe eine scharfe Abgrenzung. Die Epidermis ist im RM weiß und im FM schwarz. Die dicht aneinander gedrängten melanozytären Nester haben im RM die gleiche mittelgraue Farbe wie die unterhalb liegende Dermis. Im FM leuchten sie weiß und bilden einen starken Kontrast zur dunkelgrauen Dermis.



Abbildungung 65: Papillomatöser dermaler Nävus. Färbung: Acridine Orange

Im vergrößerten Ausschnitt dieses Nävus sind die Nester und Stränge der Melanozyten gut zu differenzieren (Abb. 66). Im RM wechseln sich hellgraue und mittelgraue Nester ab. Im FM bestehen die gleichmäßig und symmetrisch aufgebauten Nester aus unzähligen weißen Melanozyten.

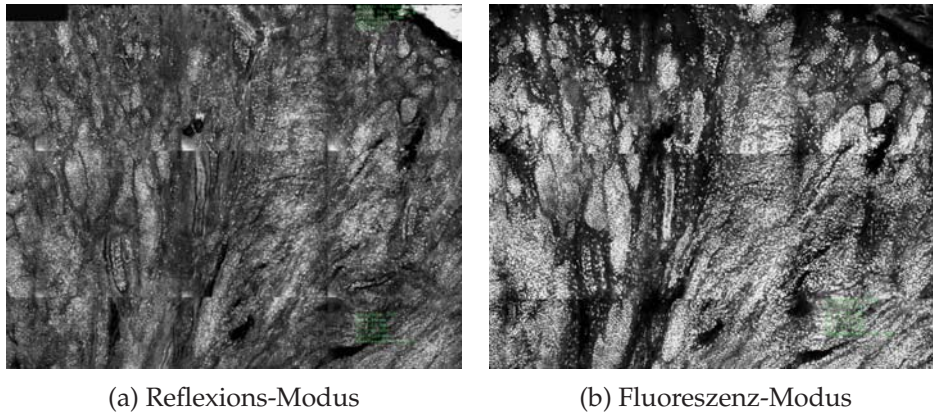


Abbildung 66: Zentraler Ausschnitt aus den melanozytären Nestern eines papillomatösen dermalen Nävus. Färbung: Acridine Orange

Bei noch stärkerer Vergrößerung sind die einzelnen Melanozyten sichtbar (Abb. 67). Sie leuchten weiß, reifen zur Tiefe hin vollständig aus und besitzen gleichmäßige Größen und Formen. Dies und das Fehlen von Zell- oder Kernpolymorphien sind typische Zeichen gut-artiger melanozytärer Läsionen. Zwischen den einzelnen Nestern der Melanozyten sind Bindegewebsfasern angeordnet, die besonders im RM deutlich abgebildet werden.

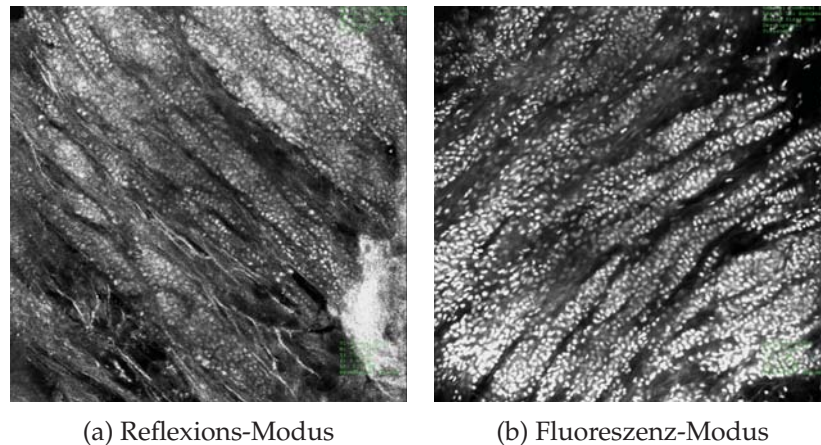
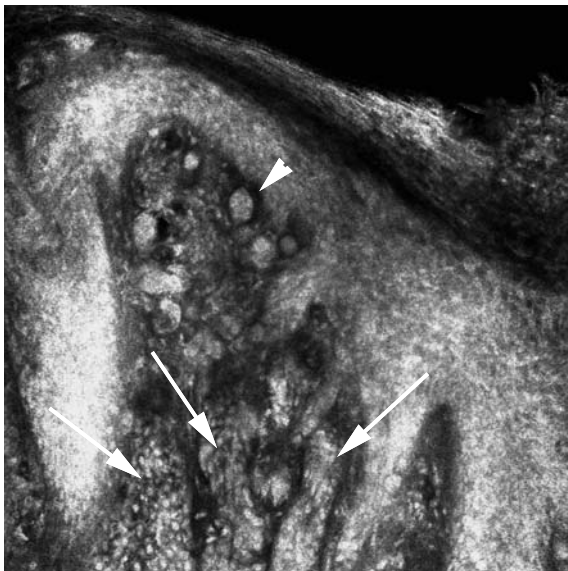


Abbildung 67: Melanozytäre Nester eines papillomatösen dermalen Nävus. Färbung: Acridine Orange

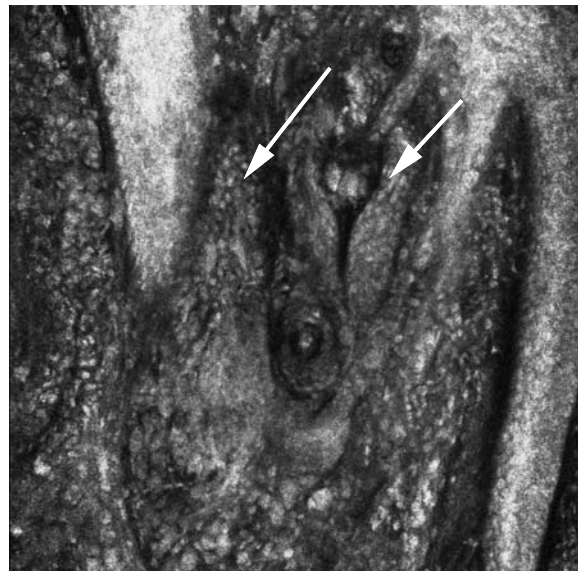
Nävus Spitz

Abbildung 68a zeigt einen Ausschnitt aus dem zentralen Anteil eines Nävus Spitz vom Compoundtyp. Die Epidermis besitzt verlängerte Reteleisten und ein stark ausgeprägtes *Stratum corneum*. Sowohl in der DEJ, als auch in der Dermis sind Melanozyten lokalisiert, die in kleinen Nestern beisammen liegen. Die für den Nävus Spitz charakteristische Spaltbildung (Pfeilspitze) zwischen den melanozytären Nestern und der angrenzenden Epidermis ist hier klar zu erkennen.

In Abb. 68b sind Aggregate aus den typischen spindelförmigen Melanozyten zu erkennen. Die melanozytären Nester in Abb. 68a und Abb. 68b zeigen das für den Nävus Spitz typische Erscheinungsbild. Im Gegensatz zu anderen Nävus-Subtypen, deren Nester eine horizontale Orientierung besitzen, sind die Nester des Nävus Spitz stets vertikal in der Längsachse orientiert (Pfeil). Sie verlaufen strangartig Richtung Korium. Die Nester der Melanozyten sind umgeben von einem lymphohistiozytären Infiltrat.



(a) Reflexions-Modus

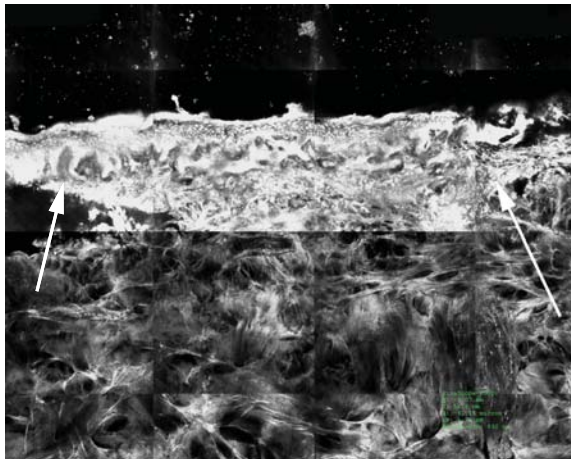


(b) Fluoreszenz-Modus

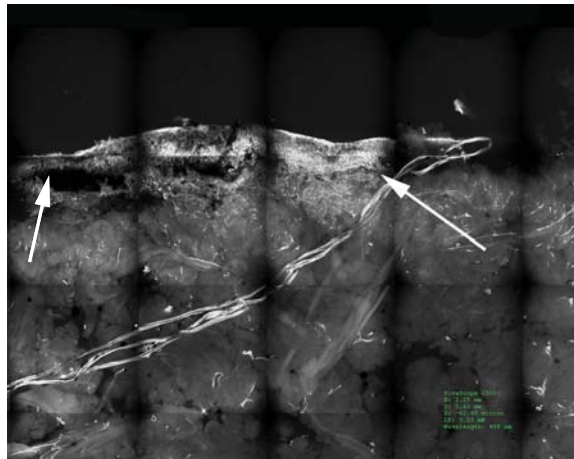
Abbildung 68: Melanozytäre Nester eines Nävus Spitz. Färbung: Acridine Orange

Atypischer oder dysplastischer Nävus

Abbildung 69 zeigt die Übersichtsaufnahme eines dysplastischen Nävus vom Compoundtyp. Die Läsion leuchtet im RM und im FM sehr hell, trotzdem sind ihre Grenzen zur Umgebung unscharf. Die Reteleisten verlaufen unregelmäßig und besitzen verschiedene Längen. In beiden Modi ist die sogenannte „Schulterbildung“ sichtbar. Dieses Phänomen beschreibt das seitliche Übertreten der melanozytären Nester der DEJ im Vergleich zu den melanozytären Nestern der Dermis (Pfeile).



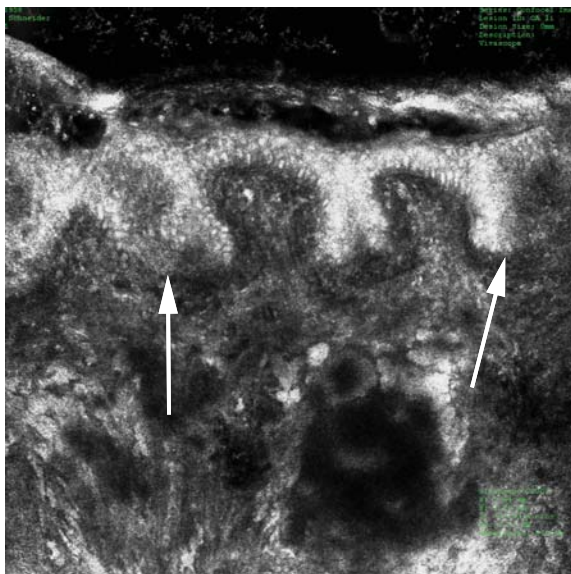
(a) Reflexions-Modus



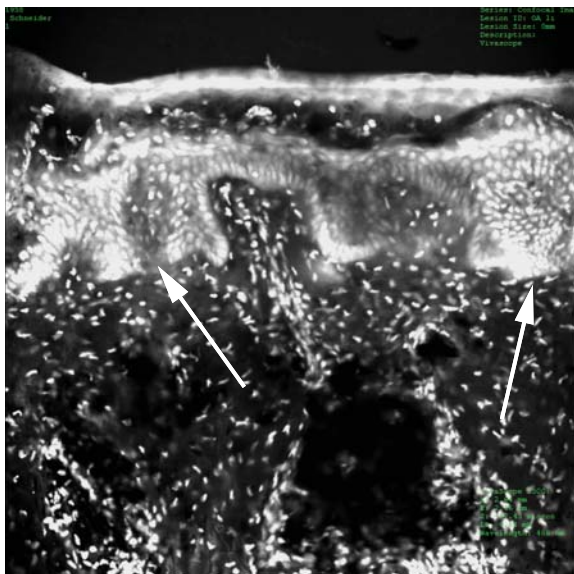
(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 69: Übersichtsaufnahme eines dysplastischen Nävus. Färbung: Acridine Orange

In Abb. 70 wird die Epidermis des Nävus aus Abb. 69 dargestellt. Sie zeigt ein typisches histologisches Merkmal dysplastischer Nävi, die „Brückenbildung“ (Pfeil). Dieser Begriff beschreibt das Verschmelzen der melanozytären Nester der DEJ, über zwei Reteleisten hinweg.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 70: Brückenbildung eines dysplastischen Nävus. Färbung: Acridine Orange

Abbildung 71 veranschaulicht ebenfalls die Aufnahme eines dysplastischen Nävus des Compoundtyps. Im RM hebt sich die mittelgraue Läsion nur leicht von der Dermis ab, im FM leuchtet sie heller. Die Epidermis ist verbreitert. Die Abgrenzung des Nävus zur angrenzenden Dermis ist unscharf. Die Nester der Melanozyten sind länglich und dicht aneinander gereiht.

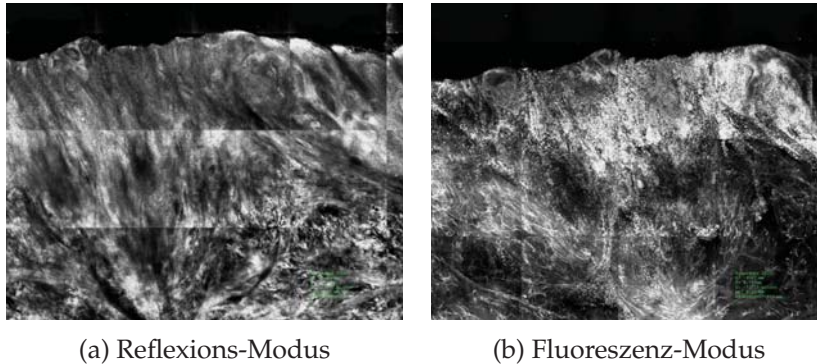


Abbildung 71: Übersichtsaufnahme einer asymmetrischen Läsion eines dysplastischen Nävus des Compoundtyps. Färbung: Acridine Orange

In der Aufnahme aus Abb. 72 ist eine klare Abgrenzung der Epidermis von der Dermis nicht möglich. Die DEJ (Pfeil) ist asymmetrisch, unruhig und verwaschen. Dieses Phänomen ist charakteristisch für dysplastische Nävi. Die dermalen melanozytären Nester (Pfeilspitze) des Nävus sind deutlich dargestellt. Im RM sind die Nester weiß und rundlich bis oval. Im FM leuchten die dermalen Nester hell weiß und sind relativ scharf von ihrer Umgebung abgegrenzt. Ebenfalls typisch sind die subepidermale konzentrische Fibrose die sich im RM beobachten lässt und das interstitielle gemischtzellige Entzündungsinfiltrat der Dermis das besonders im FM hervorgehoben wird.

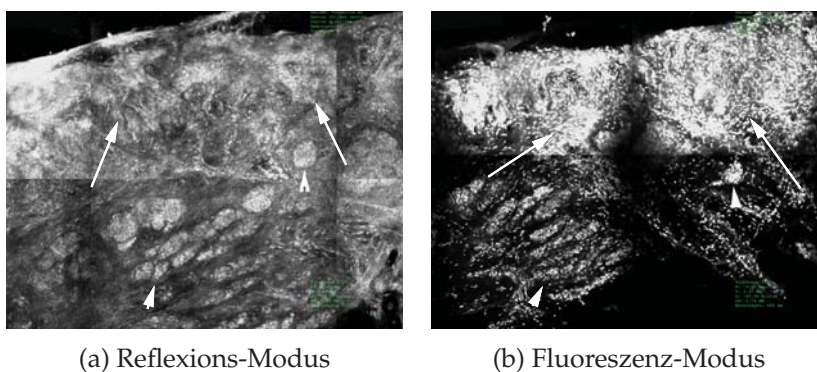
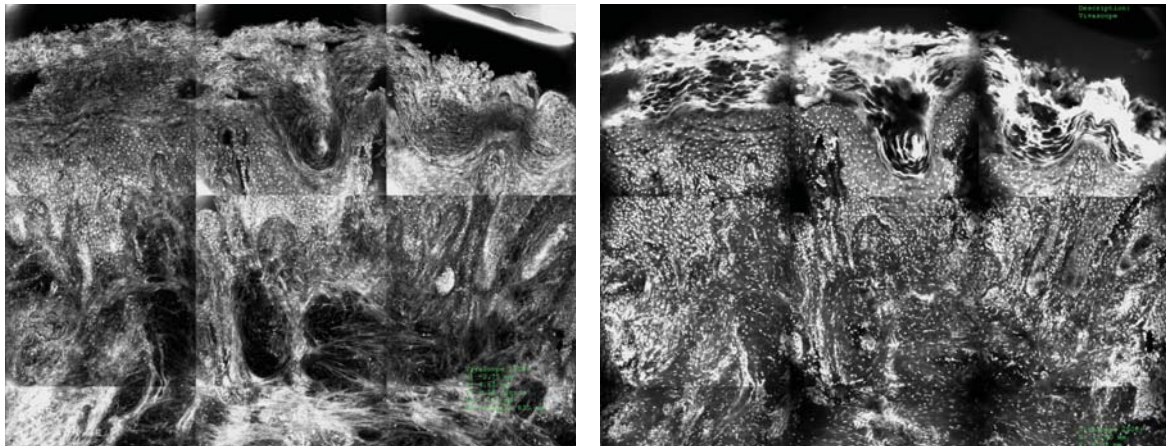


Abbildung 72: DEJ und dermale melanozytäre Nester eines dysplastischen Nävus. Färbung: Acridine Orange

5.5 Aufnahmen der Präkanzerosen in der KLM

5.5.1 Aktinische Keratose

Abbildung 73 zeigt eine Übersichtsaufnahme einer hypertrophen Aktinischen Keratose (AK). Auffällig ist die Hyperkeratose der verbreiterten Epidermis, sowie das lymphohistiozytäre Infiltrat der Dermis das besonders im FM hell weiß leuchtet.



(a) Reflexions-Modus

(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 73: Übersichtsaufnahme einer hypertrophen AK. Färbung: Acridine Orange

Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 74) lässt sich die charakteristische Unordnung der basalen Zellschicht (Pfeil) deutlich erkennen. Die Pleomorphie der Zellkerne der Basalzellen ist im FM besser zu sehen, da im RM die Grenzen der weißen Zellkerne unscharf sind und miteinander verschwimmen. In der Dermis befinden sich zahlreiche weiß leuchtende Lymphozyten (Pfeilspitzen) des entzündlichen Infiltrats. Auch diese sind im FM kontrastreicher.

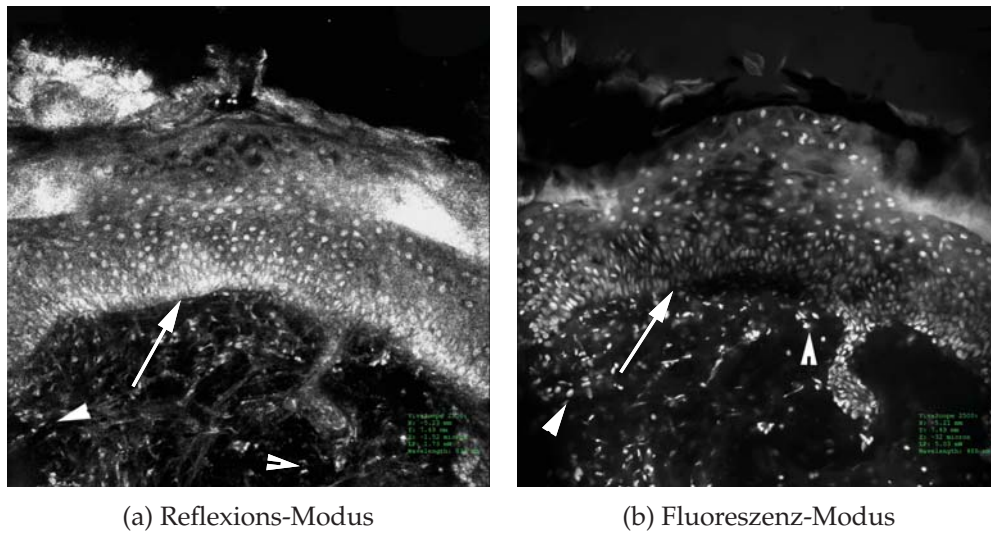


Abbildung 74: Epidermis einer AK. Färbung: Acridine Orange

Bei der bowenoiden Form der AK sind neben der Basalzellschicht auch alle anderen Schichten der Epidermis betroffen. Die bowenoiden AK in Abb. 75 zeigt eine ungeordnete, unruhige Epidermis deren Zellen unterschiedliche Formen und Größen besitzen. Auffallend sind die großen, vielgestaltigen Zellkerne (Pfeil) im *Stratum spinosum* und *Stratum basale*. Die Membranen der Zellen lassen sich im RM besser differenzieren als im FM. Die Dermis wird von einem hell leuchtenden Infiltrat aus Lymphozyten und Histiozyten (Pfeilspitze) dominiert.

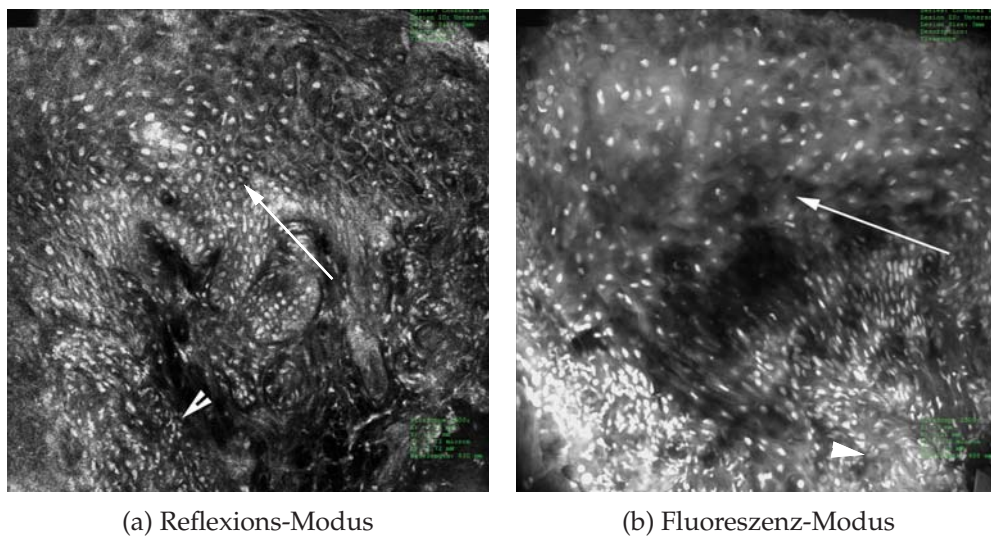


Abbildung 75: Ausschnitt einer bowenoiden AK. Färbung: Acridine Orange

Der für die AK typische Wechsel zwischen einer Hyperorthokeratose und einer Hyperparakeratose (Flaggenzeichen) wird in den Abbildungen des konfokalen Mikroskops deutlich dargestellt. Abbildung 76 zeigt das *Stratum corneum* einer pathologisch veränderten Epidermis. Die Helligkeitsstufen sind im RM und im FM konträr. So erscheint die Hyperorthokeratose (Pfeil) im RM weiß, ebenso wie das physiologische *Stratum corneum*. Im FM ist sie schwarz und zeigt nur wenige weiße Bereiche. Die Hyperparakeratose (Pfeilspitze) leuchtet im FM hell weiß da die Keratinozyten des *Stratum corneum* hier noch Kerne enthalten. Im RM besitzt dieser Bereich eine homogene mittelgraue Farbe, da die weißen Keratohyalin granula fehlen.

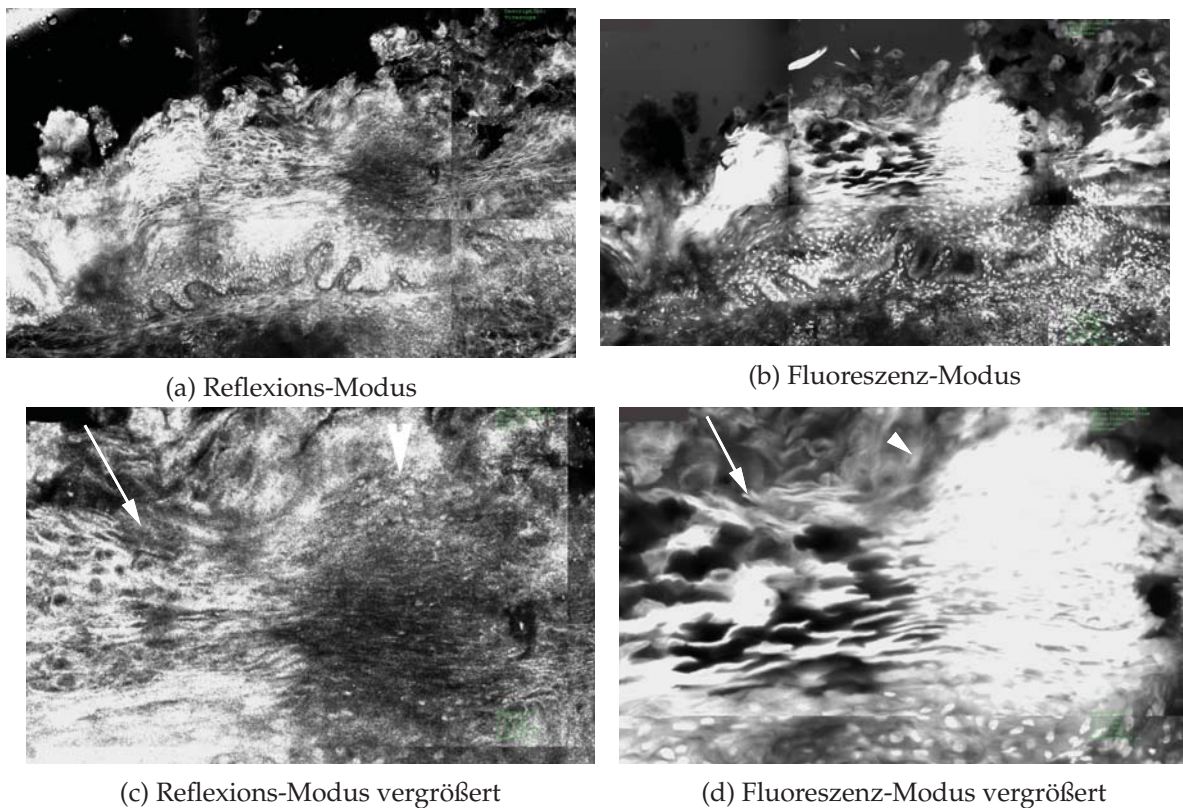


Abbildung 76: Wechsel zwischen Hyperorthokeratose und Hyperparakeratose einer AK (a+b) und ein vergrößerter Ausschnitt des *Stratum corneum* (c+d). Färbung: Acridine Orange

Charakteristisch für die Hyperparakeratose ist ein verbreitertes *Stratum corneum* mit Keratinozyten die ihren Zellkern noch nicht verloren haben. Darstellung 77 zeigt das *Stratum corneum* vergrößert. Die parallel, wellenartig angeordneten Hornschichten sind im RM teilweise von dunkelgrauer und teilweise von weißer Farbe. Im FM wirken sie homogen und hellgrau bis mittelgrau. Das pathologische Auftreten von Zellkernen (Pfeil) in dieser

Schicht ist im FM deutlicher zu erkennen, da sich die weißen Zellkerne stärker von ihrer Umgebung abheben.

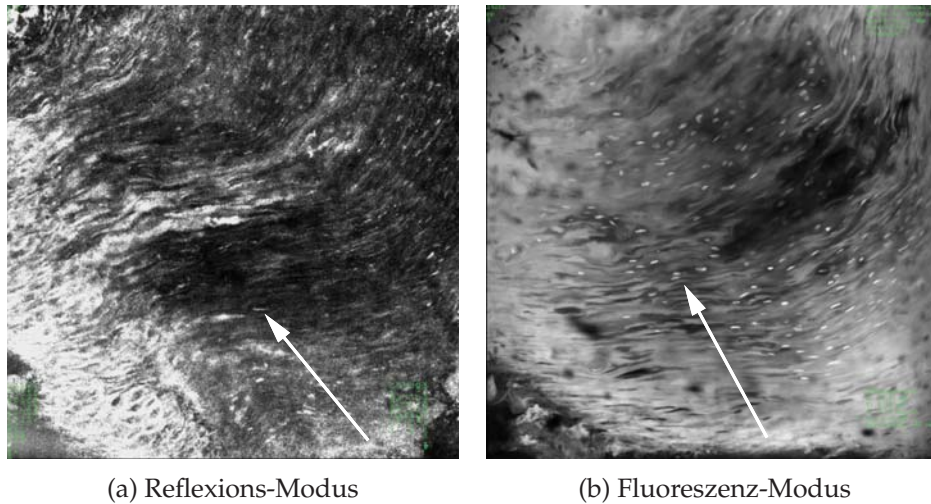


Abbildung 77: Hyperparakeratose einer AK. Färbung: Acridine Orange

Die Unordnung der Basalzellschicht (Pfeil) wird in den beiden Aufnahmen aus Abb. 78 noch einmal besonders deutlich. Diese für die Diagnosestellung bedeutendste Eigenschaft ist im FM meist leichter zu erkennen als im RM. Abb. 78a veranschaulicht außerdem die typische Formierung der Parakeratose (Pfeilspitze) der AK. Das lymphohistiozytäre Infiltrat tritt hier besonders deutlich hervor. Außerdem ist zu erkennen, dass die Basalmembran intakt ist. Ein invasives Wachstum findet also nicht statt.

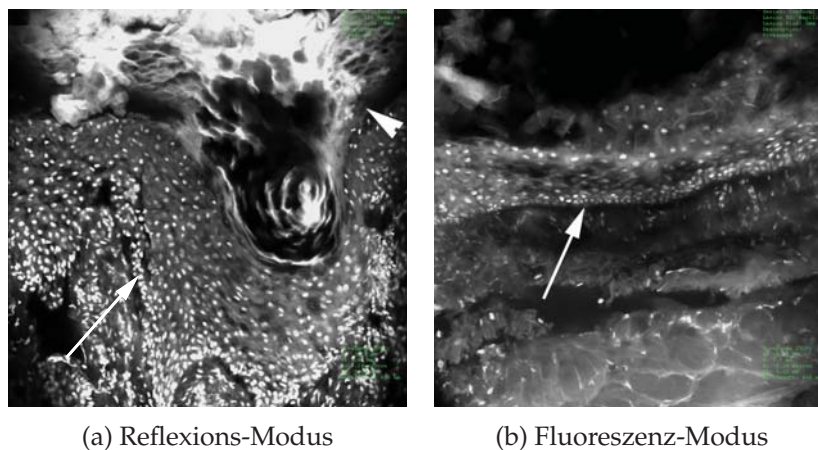


Abbildung 78: Ausschnitt einer AK mit ungeordneter Basalzellschicht. Färbung: Acridine Orange

5.5.2 Morbus Bowen

Abbildung 79 zeigt einen Ausschnitt eines Präparats des M. Bowen. Eine Schichtungsstörung der Epidermis zeigt sich in allen Bereichen. Die Keratinozyten aller Schichten besitzen eine atypische Form. Das vorherrschende lymphohistiozytäre Infiltrat der papillären Dermis zeigt sich auch hier im FM klarer als im RM.

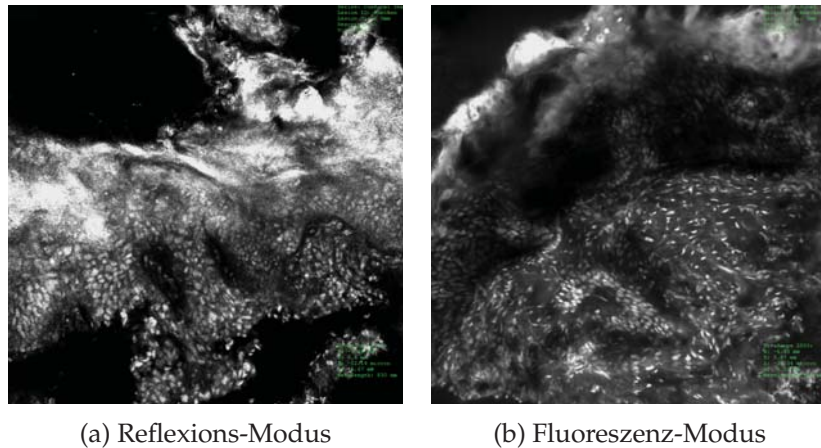


Abbildung 79: Epidermis eines M. Bowen. Färbung: Acridine Orange

Dass alle Schichten der Epidermis von der Dysplasie betroffen sind, wird in der Aufnahme aus Abb. 80 nochmal hervorgehoben. Aufgrund der zahlreichen atypischen Keratinozyten ist eine Unterscheidung der einzelnen Schichten fast nicht mehr möglich. In einzelnen Abschnitten erscheint die Basalzellschicht der Epidermis völlig geordnet und unauffällig (Pfeil).

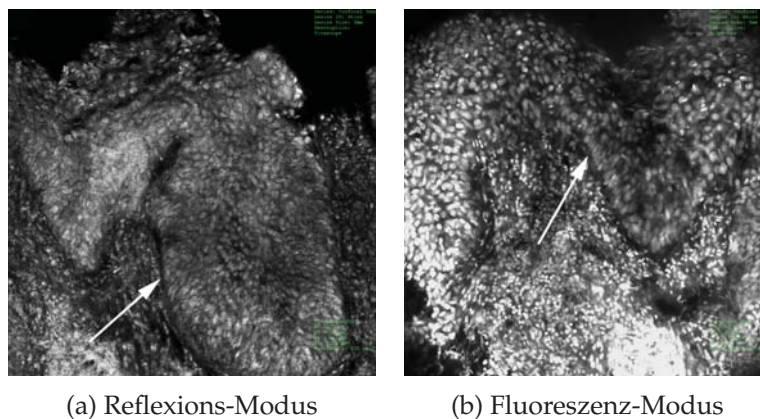
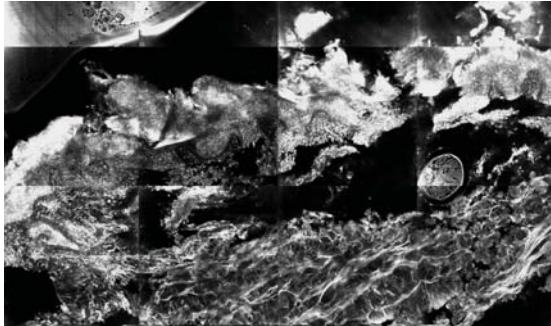
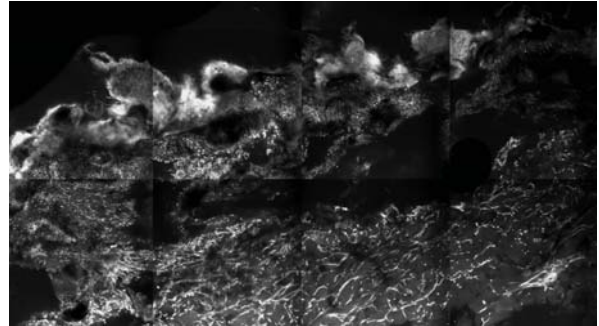


Abbildung 80: Epidermis und DEJ eines M. Bowen. Färbung: Acridine Orange

Eine Übersichtsaufnahme des M. Bowen wird in Abb. 81 gezeigt. In diesem Präparat hat sich die akanthotisch verbreiterte Epidermis stellenweise von der Dermis abgelöst. Eine unruhige Hyperkeratose ist sowohl im RM als auch im FM zu erkennen.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 81: Übersichtsaufnahme eines M. Bowen. Färbung: Acridine Orange

5.6 Aufnahmen semimaligner Tumoren in der KLM

Oberflächliches Basalzellkarzinom

Die Tumorzellverbände des oberflächlichen BZK die von der Epidermis ausgehen, sind ausschließlich in den oberen Hautschichten lokalisiert und reichen maximal bis ins obere Korium. Abb. 82 zeigt ein oberflächliches BZK mit zwei deutlich voneinander abgegrenzten Tumorinseln (Pfeile), die sich im *Stratum papillare* der Dermis befinden. Sowohl im FM als auch im RM erscheinen die Tumorinseln weiß und sind klar von dem umliegenden Bindegewebe abgegrenzt. Bei der oberen Insel ist der schwarze Saum (Pfeilspitze) um die Tumorinsel, der durch die peritumorale Spaltbildung entsteht, gut zu sehen.

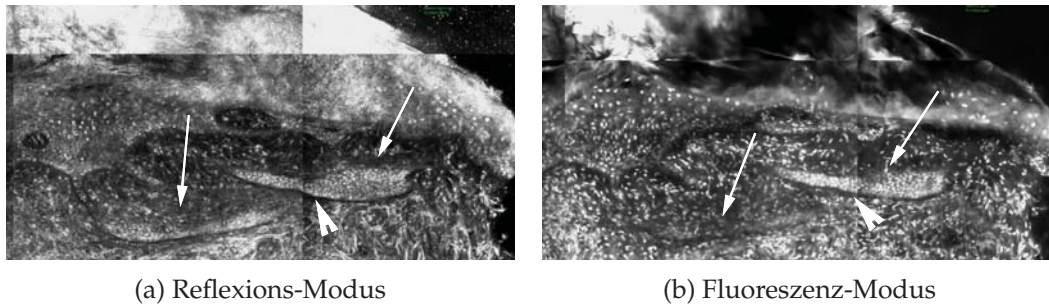


Abbildung 82: Übersichtsaufnahme eines oberflächlichen BZK. Färbung: Acridine Orange

Noduläres Basalzellkarzinom

Abbildung 83 zeigt die Übersicht eines nodulären BZK. In der KLM sind die großen, an Talgdrüsen erinnernden Tumorzellverbände charakteristisch, die in die tiefen Schichten der Dermis und auch der Subkutis infiltrieren. Die Tumorinseln sind von unterschiedlicher Größe und besitzen meist asymmetrische Formen. Durch die starke Chromatinverdichtung erscheinen die Kerne der Tumorzellen besonders hell, sodass die Tumorinseln im RM hellgrau sind und im FM weiß leuchten. In diesem Präparat ist die peritumorale Spaltbildung (Pfeil) besonders gut zu beobachten.

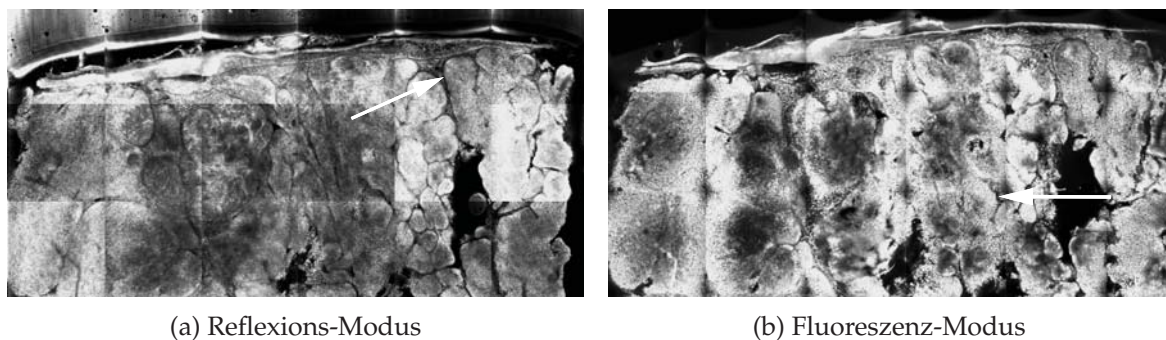
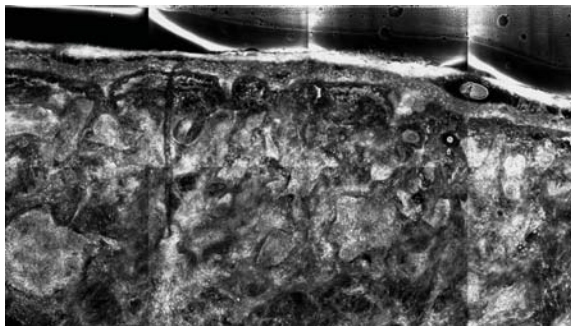


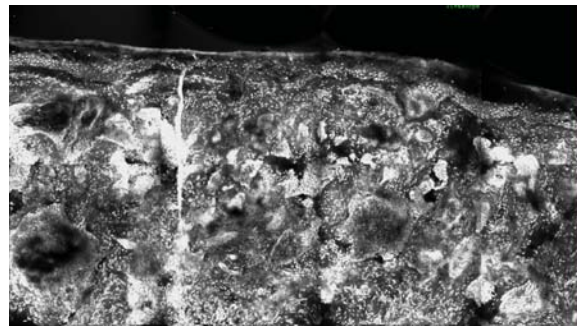
Abbildung 83: Übersichtsaufnahme eines nodulären BZK. Färbung: Acridine Orange



Abbildung 86 zeigt ebenfalls ein noduläres BZK, allerdings sind die Tumorinseln hier noch asymmetrischer und unregelmäßiger. Die gesamte Dermis ist durchsetzt von hellgrauen, mittelgrauen und weißen Tumornestern und besitzt ein unruhiges Muster. Die peritumorale Spaltbildung ist hier weniger deutlich. Ein vergrößerter Ausschnitt dieses Präparats wird in Abb. 86 gezeigt. Hier ist die komplette Durchsetzung der Dermis mit Tumorzellen zu beobachten.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 86: Übersichtsaufnahme eines asymmetrischen, nodulären BZK. Färbung: Acridine Orange

In Abb. 87 ist ein Ausschnitt eines nodulären BZK vergrößert dargestellt. Die asymmetrischen Formen der Tumorinseln und die Spaltbildungen (Pfeilspitzen) zwischen den einzelnen Tumorknoten und ihrer Umgebung zeigen sich hier sehr deutlich. Interessant ist ebenso die Palisadenstellung (Pfeil) der Zellkerne der Tumorzellen. Die Farbe der Zellen variiert hier zwischen weiß und mittelgrau.

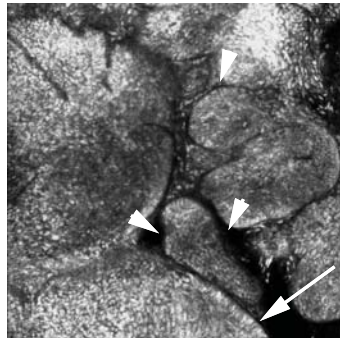


Abbildung 87: Tumorinseln eines nodulären BZK im RM. Färbung: Acridine Orange

Das Präparat der Abb. 88 wurde als ulzeriertes, noduläres BZK klassifiziert. Die Ulzeration (Pfeil) ist durch den deutlich sichtbaren Abriss der Epidermis von der Dermis definiert. Am linken Rand des Präparats ist die Verbindung zwischen Epidermis und Dermis noch

intakt. In der Mitte und am rechten Rand jedoch ist die Epidermis vollständig von der vom Tumor befallenen Dermis getrennt.

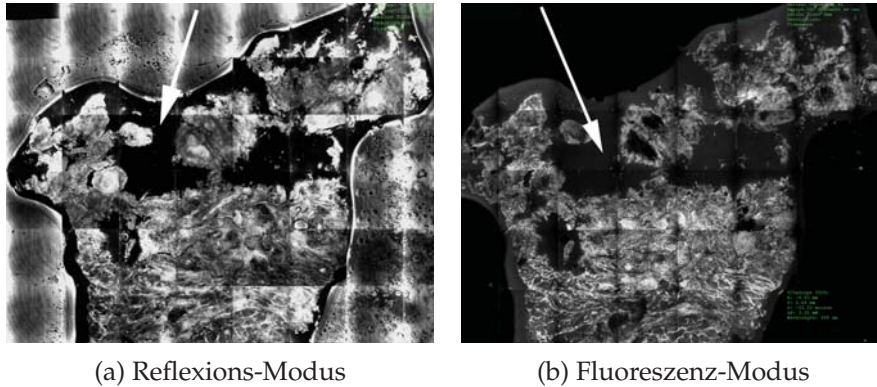


Abbildung 88: Ulzeriertes noduläres BZK. Färbung: Acridine Orange

Ein häufiger Fehler bei der Diagnose von BZK in der KLM ist die Verwechslung einer Tumorinsel mit einer gewöhnlichen Talgdrüse. Abb. 89a zeigt einen Tumorzellverband eines nodulären BZK im RM und Abb. 89b zeigt eine Talgdrüse im RM. Beide Präparate wirken relativ homogen weiß und hellgrau. Sie sind scharf von ihrer Umgebung abgegrenzt, allerdings ist bei der Tumorinsel die typische peritumorale Spaltbildung (Pfeil) in Form eines schwarzen Saums sichtbar. Die Kapsel der Talgdrüse (Pfeilspitze) bildet eine scharfe Grenze zu ihrer Umgebung, jedoch ohne Spaltbildung. Bei genauer Betrachtung unterscheidet sich auch das Muster der beiden Präparate. Die Talgdrüse weist eine körnige Struktur auf, die durch die einzelnen Lipidtröpfchen hervorgerufen wird. In der Tumorinsel sind die einzelnen Kerne zu erkennen, die aufgrund des verdichteten Chromatins hell leuchten. In einigen Bereichen scheint es als würden die Kerne verschmelzen.

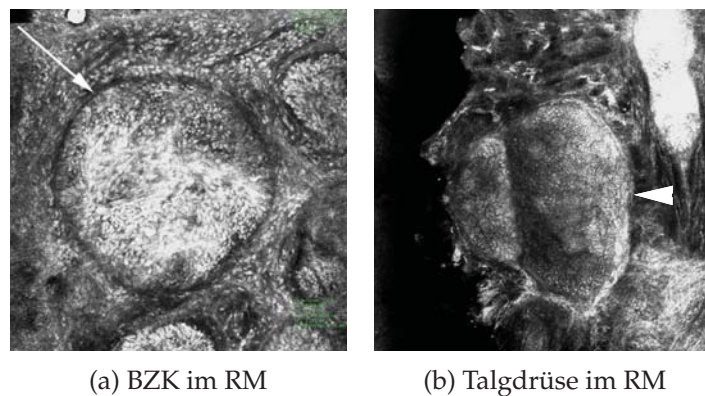


Abbildung 89: Tumorinsel eines BZK und gewöhnliche Talgdrüse. Färbung: Acridine Orange

Mikronoduläres Basalzellkarzinom

Im Gegensatz zum nodulären BZK ist die Größe der einzelnen Tumornester beim mikronodulären BZK sehr viel geringer. Abb. 90 zeigt ein mikronoduläres BZK, welches die gesamte Dermis vollständig durchsetzt, sodass keine physiologischen Strukturen mehr zu erkennen sind. Die einzelnen kleinen Tumornester (Pfeil) liegen sehr dicht beisammen, wodurch eine Differenzierung der einzelnen Nester in der Übersichtsaufnahme nicht möglich ist. Im RM erscheint die Tumorstruktur weiß bis hellgrau. Im FM leuchten einige Bereiche des Tumors weiß, während andere Bereiche relativ homogen mittelgrau gefärbt sind.

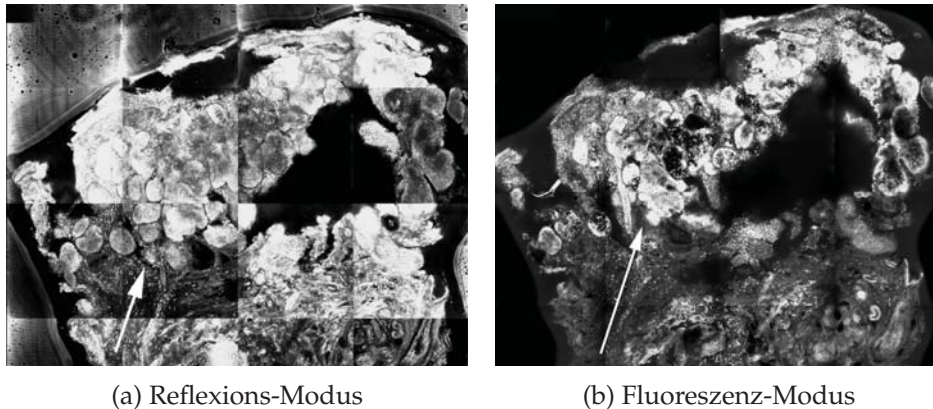


Abbildung 90: Mikronoduläres BZK. Färbung: Acridine Orange

In Abb. 91 ist ein Ausschnitt aus dem Präparat der Abb. 90 im RM vergrößert dargestellt. Hier sind die einzelnen kleinen, sehr dicht beieinander liegenden Tumoringeln zu erkennen. Im RM und im FM sind sie weiß bis hellgrau, da die einzelnen Zellkerne hell leuchten. Das Phänomen der Spaltbildung ist bei einigen Tumoringeln zu beobachten (Pfeil).

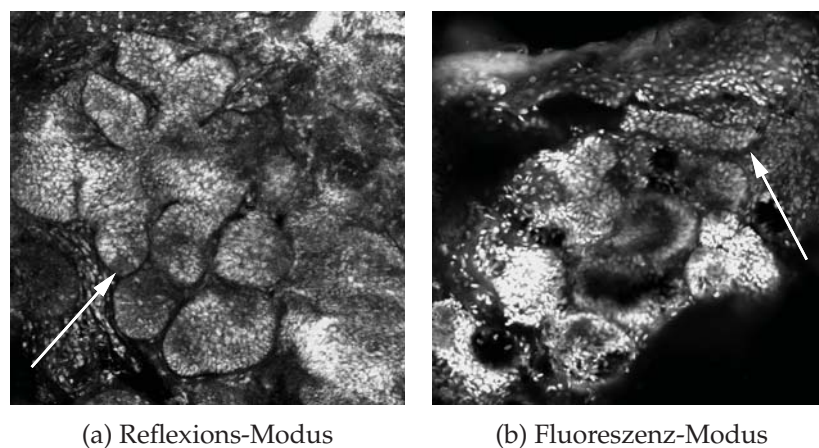
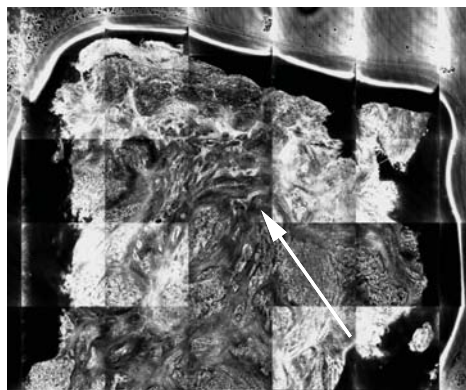


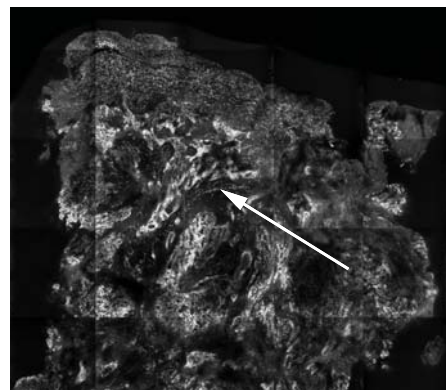
Abbildung 91: Tumoringeln eines mikronodulären BZK. Färbung: Acridine Orange

Sklerodermiformes Basalzellkarzinom

Das histologische Bild des sklerodermiformen BZK zeigt deutliche Unterschiede zu den Bildern des nodulären und mikronodulären BZK. Im Präparat der Abb. 92 lassen sich die Eigenschaften des sklerodermiformen BZK gut beschreiben. Anstatt nestförmiger Aggregate bilden die Tumorzellen hier strangartige Formationen (Pfeil). Sie durchsetzen vertikal die gesamte Dermis und sind in fibrotische Bindegewebsstränge eingebettet. Die Areale des Tumors erscheinen im RM weiß bis hellgrau und im FM leuchtend weiß. Die bindegewebigen Stränge, welche die einzelnen Tumorbänder voneinander trennen sind sowohl im RM als auch im FM dunkelgrau bis schwarz.



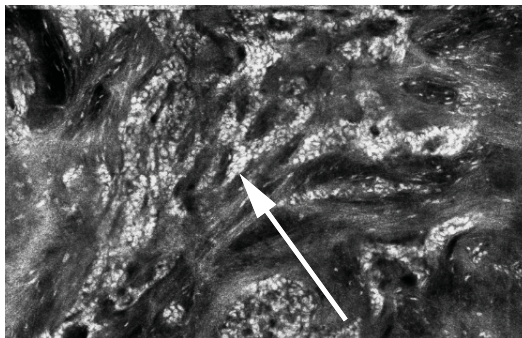
(a) Reflexions-Modus



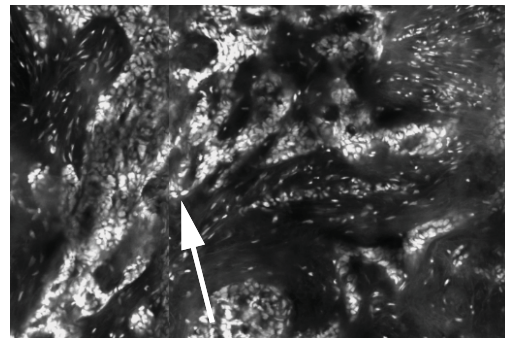
(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 92: Sklerodermiformes BZK. Färbung: Acridine Orange

Ein Ausschnitt aus dem Präparat der Abb. 92 wird in der Abb. 93 noch einmal vergrößert gezeigt. Die hellen Tumorstränge (Pfeil) sind hier gut zu erkennen und scheinen scharf von ihrer Umgebung abgegrenzt. Im FM leuchten die Areale des Tumors heller als im RM.



(a) Reflexions-Modus

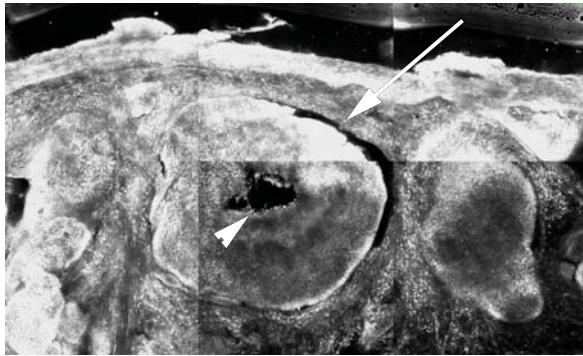


(b) Fluoreszenz-Modus

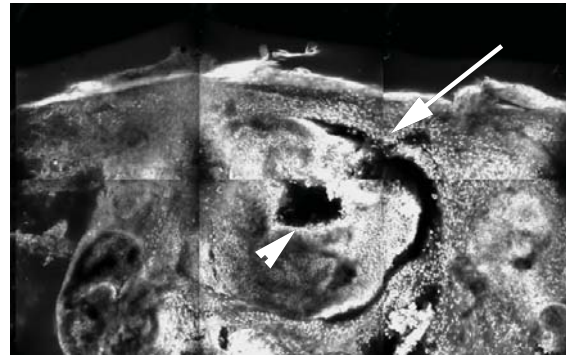
Abbildung 93: Tumorgewebe eines sklerodermiformen BZK. Färbung: Acridine Orange

Zystisches Basalzellkarzinom

Abbildung 94 zeigt das Präparat eines zystisch-nodulären BZK. Die großen Tumornester in der Dermis entsprechen dem nodulären Anteil des Tumors. Auffallend ist die sehr große, weiße bis mittelgraue Tumorinsel (Pfeil) mit einer ausgeprägten zirkulären Spaltbildung. Zentral in der Tumorinsel befindet sich ein zystisch degenerierter Hohlraum (Pfeilspitze), der sowohl im RM als auch im FM schwarz abgebildet ist.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 94: Zystisches BZK. Färbung: Acridine Orange

5.7 Aufnahmen maligner Tumoren in der KLM

5.7.1 Plattenepithelkarzinom der Haut

Abbildung 95 zeigt die Übersichtsaufnahme eines Präparats eines PEK der Haut. Im RM erscheint das gesamte Tumorgewebe weiß. Einzelne von der Epidermis ausgehende, breite Zapfen und Stränge sind zu erkennen. Im FM stellen sich die Stränge mittel- bis dunkelgrau dar, besitzen aber auch einige helle Areale.

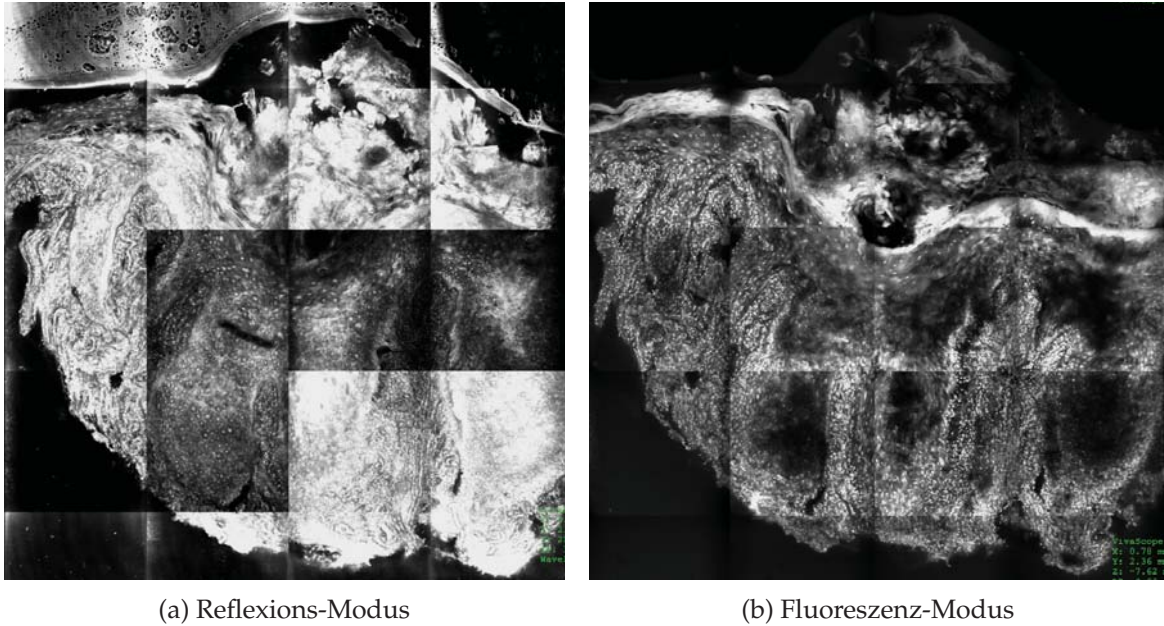
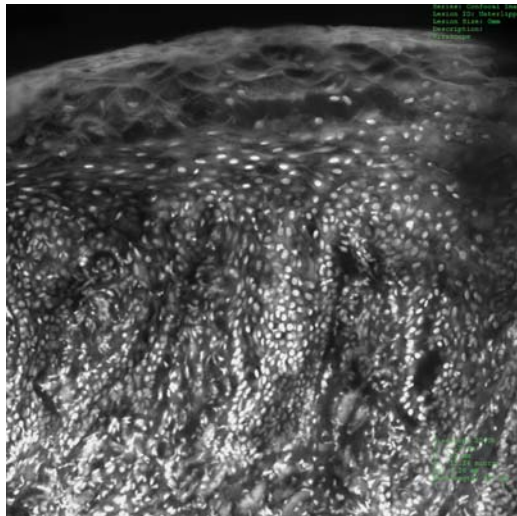
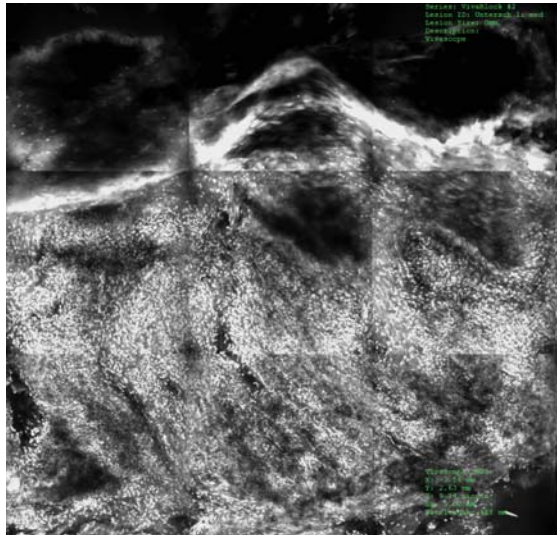


Abbildung 95: Übersichtsaufnahme eines PEK der Haut. Färbung: Acridine Orange

Bei stärkerer Vergrößerung können die typischen Merkmale des PEK beobachtet werden (Abb. 96). Die Keratinozyten aller Schichten der Epidermis sind atypisch. Die Verhornungsstörung des *Stratum corneum* lässt sich durch das Vorhandensein von Zellkernen belegen. Die Tumorzellen bilden breite Stränge und Zapfen, die von der Epidermis aus in das Korium vordringen. Im RM heben sich die Tumorareale stärker von ihrer Umgebung ab, da die Dermis dunkelgrau ist. Im FM wird der Kontrast zwischen Tumorgewebe und intakter Dermis durch das hell leuchtende lymphohistiozytäre Infiltrat vermindert.



(b) Fluoreszenz-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Das initiale PEK nimmt seinen Ursprung in der Epidermis und bildet zapfenförmige Ausstülpungen in die Dermis hinein. Teilweise erinnern diese an eine Lanze (Pfeil) aufgrund ihrer spitz zulaufenden Form. Im RM sind die Tumorareale weiß bis hellgrau und bilden eine scharfe Grenze zur dunkelgrauen Dermis. Das weiße lymphohistiozytäre Infiltrat der Dermis macht eine Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und Umgebung im FM schwer.

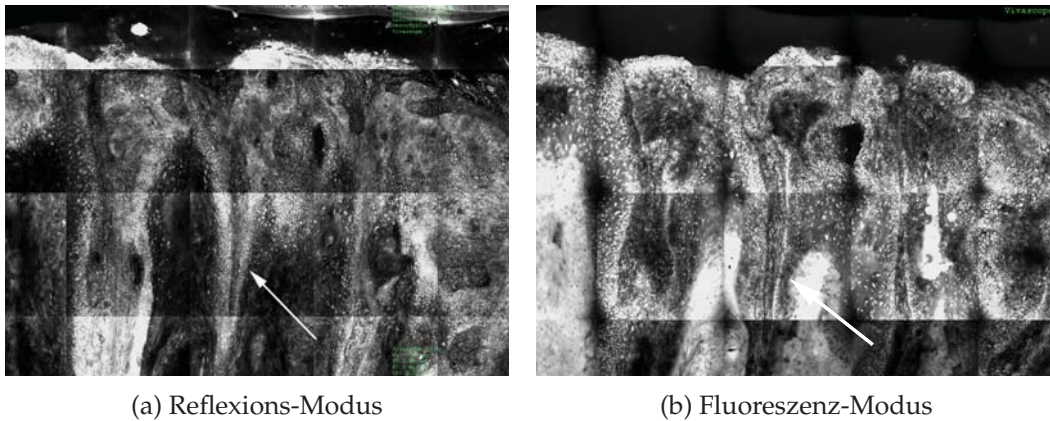


Abbildung 98: Initiales PEK der Haut. Färbung: Acridine Orange

Durch die ausgeprägte Pleomorphie der Tumorzellen entsteht ein lebhaftes Bild (Abb. 99). Im RM können Tumorzellen sehr unterschiedlicher Größe erkannt werden, die dicht beieinander liegen. Im FM werden die bizarren Formen der weiß leuchtenden Zellkerne sehr genau dargestellt. Die Größe der dicht aneinander gedrängten Zellkerne variiert sehr stark.

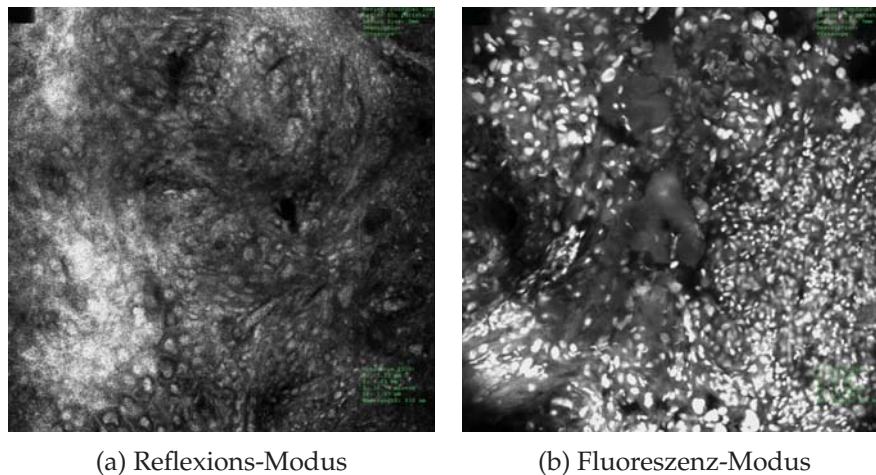


Abbildung 99: Tumorzellen eines PEK der Haut. Färbung: Acridine Orange

Hochdifferenzierte PEK besitzen die Eigenschaft zur Ausbildung von Hornperlen (Abb. 100). Diese können im gesamten Bereich des Tumorgewebes auftreten. Sie besitzen ein helles homogenes Zentrum (Pfeil), welches von konzentrischen Ringen aus verhornenden Tumorzellen umgeben ist. Die Grenzen der pleomorphen Tumorzellen sind hier gut zu erkennen.

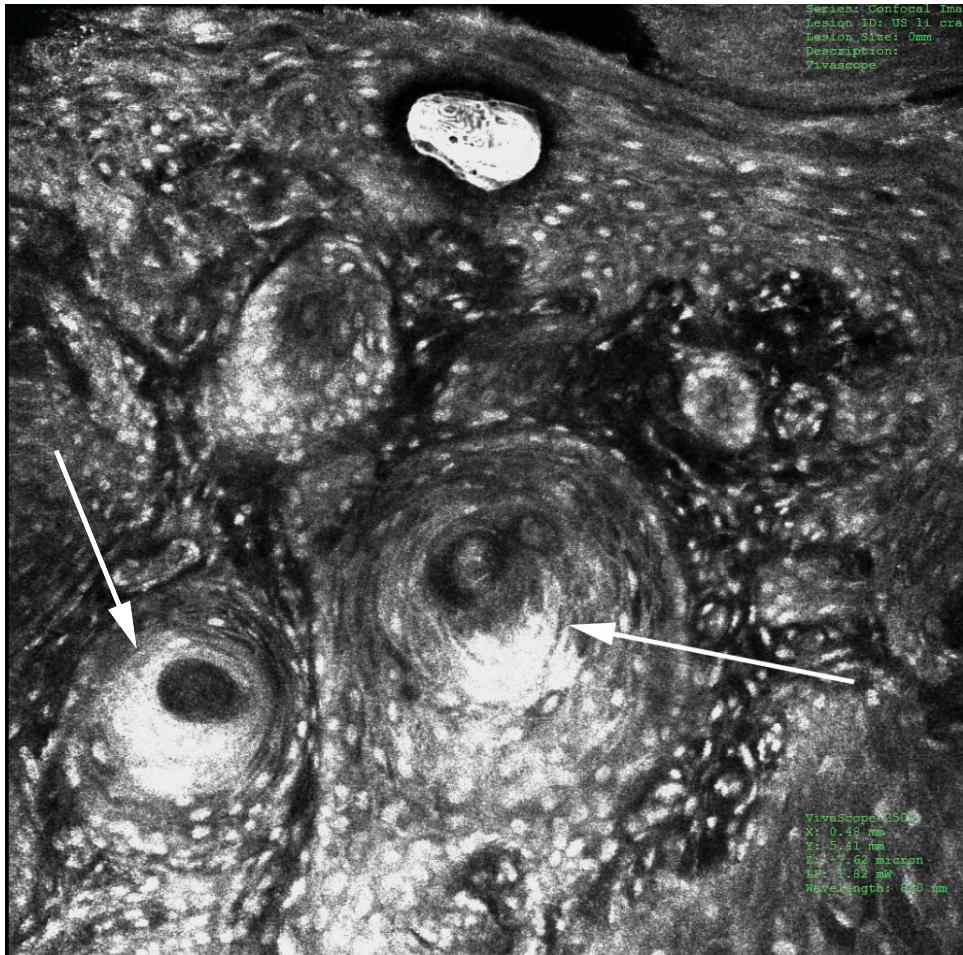


Abbildung 100: Hornperlen eines PEK der Haut im RM. Färbung: Acridine Orange

Abbildung 101 zeigt eine solche Hornperle, eingebettet in Tumorgewebe. Sie besitzt im RM ein weißes Zentrum, das von konzentrischen mittel- bis dunkelgrauen Ringen umgeben ist. Innerhalb der Ringe lassen sich einzelne Zellkerne (Pfeil) von noch nicht vollständig verhornten Zellen erkennen. Im FM ist das Zentrum der Hornperle homogen schwarz. Die Zellen des umliegenden Tumorgewebes besitzen atypische Kerne.

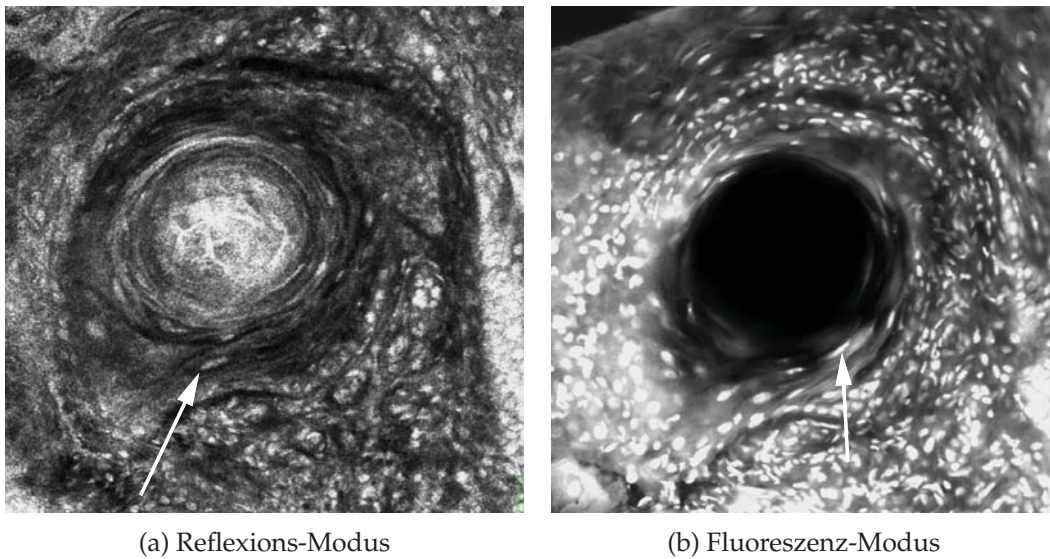


Abbildung 101: Hornperle eines PEK der Haut. Färbung: Acridine Orange

Interessant zu beobachten ist die Entstehung einer solchen Hornperle in Abb. 102. In dem kleinen Zentrum befinden sich schon vollständig verhornte Zellen. Auffallend ist, dass das Zentrum im RM dunkelgrau und im FM weiß erscheint. Auch hier ist das Zentrum von konzentrischen Ringen umgeben, jedoch ist der größte Teil der Zellen noch nicht verhornt und besitzt einen weißen Kern.

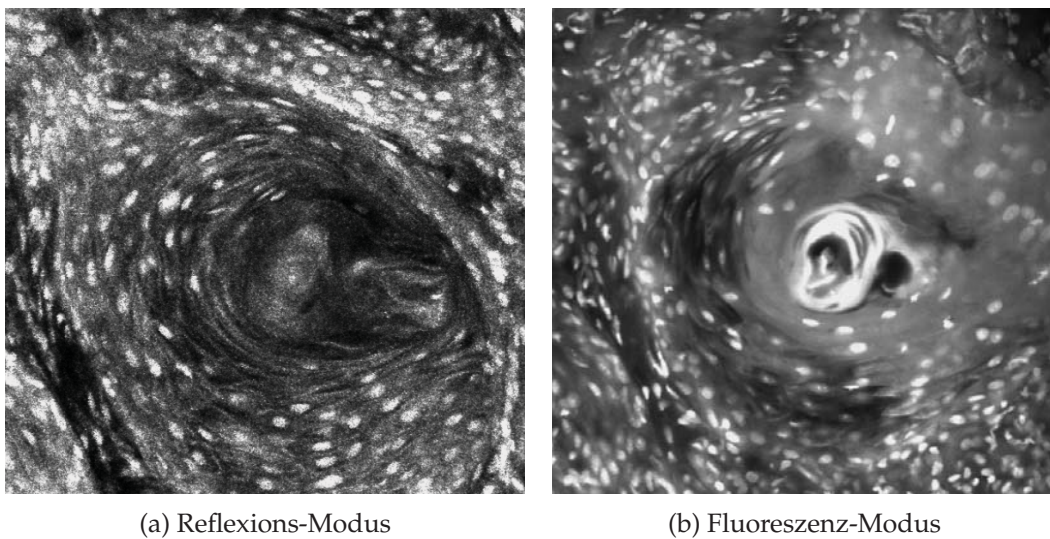
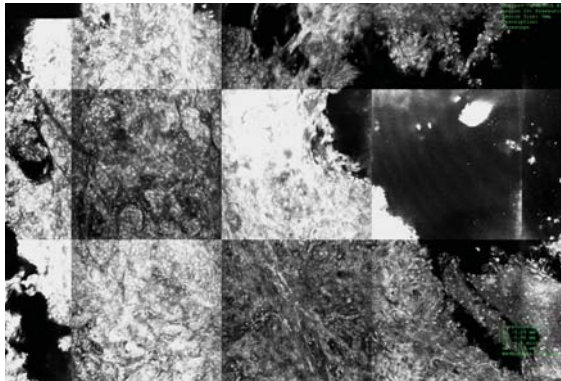
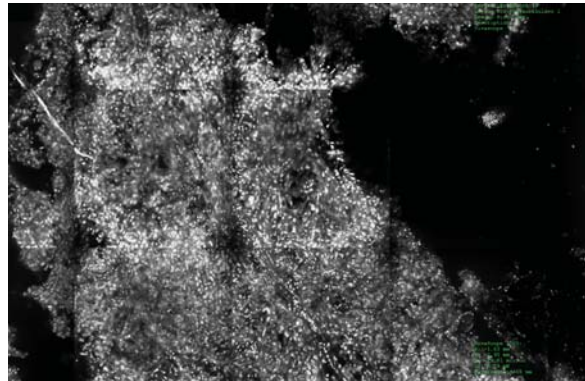


Abbildung 102: Entstehung einer Hornperle. Färbung: Acridine Orange

Abbildung 103 zeigt die Metastase eines PEK. Physiologische Strukturen der Dermis oder Epidermis sind hier nicht mehr festzustellen. Das Tumorgewebe besteht aus Aggregaten von atypischen Keratinozyten, die bizarre Formen besitzen. Im RM leuchten sie weiß und im FM haben sie eine hellgraue bis mittelgraue Farbe.



(a) Reflexions-Modus

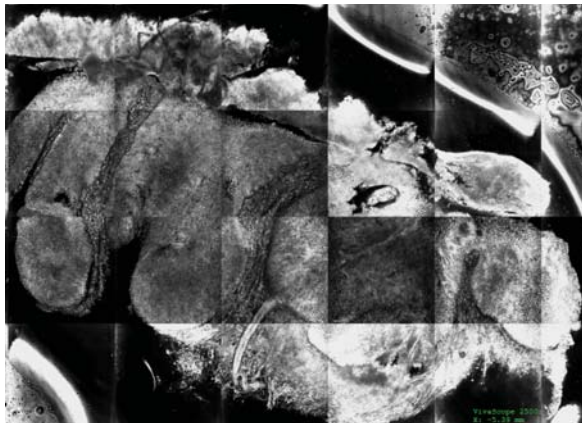


(b) Fluoreszenz-Modus

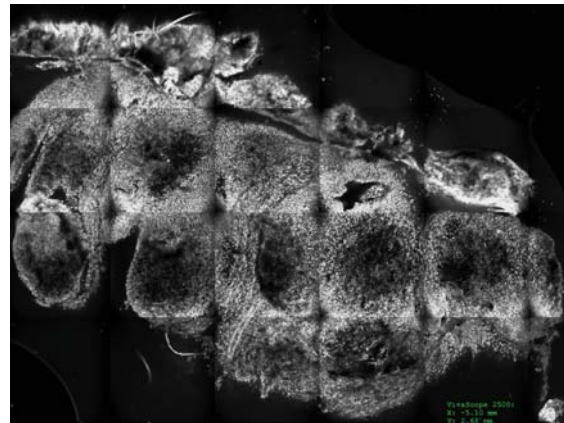
Abbildung 103: Metastase eines PEK der Haut. Färbung: Acridine Orange

Bowen-Karzinom

Das Bowen-Karzinom, welches auch in die Gruppe der Plattenepithelkarzinome eingeordnet wird und aus einem M. Bowen hervorgeht, besitzt ballonförmige Tumoreareale, die von der Epidermis ausgehen (Abb. 104). Innerhalb dieser homogen wirkenden Areale befinden sich zahlreiche, atypische Tumorzellen mit multiplen, atypischen Mitosen. Das fibrotische Bindegewebe welches die Tumorsepten voneinander trennt, lässt sich im RM deutlicher abgrenzen als im FM.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 104: Übersichtsaufnahme eines Bowen-Karzinoms. Färbung: Acridine Orange

Abb. 105 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Präparats. Im RM sind die Tumorareale hellgrau und von der dunkelgrauen Dermis nur unscharf abgegrenzt (Pfeil). Diese Grenze ist auch im FM nicht klar zu erkennen, da das lymphohistiozytäre Infiltrat die gleiche Struktur und weiße Farbe wie das Tumorgewebe besitzt. Die Basalmembran ist im Gegensatz zum M. Bowen nicht mehr intakt und das Tumorgewebe erstreckt sich bis in die Dermis.

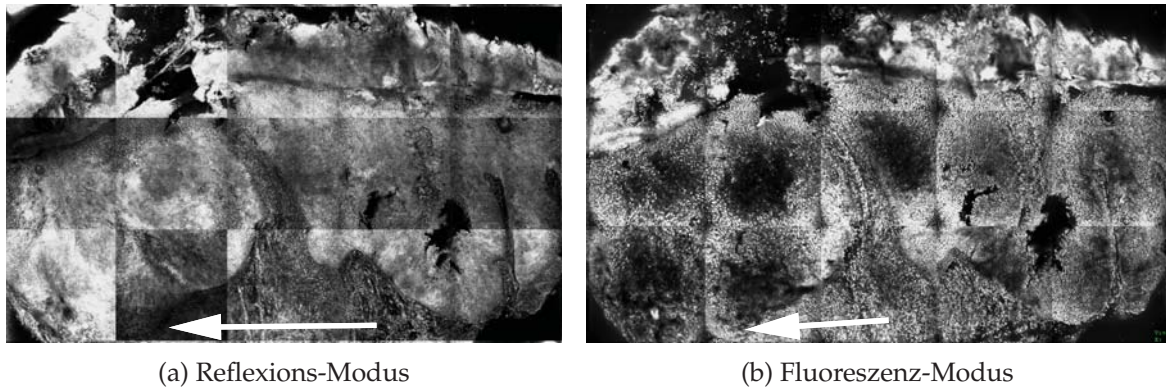


Abbildung 105: Epidermis eines Bowen-Karzinoms. Färbung: Acridine Orange

Eine noch stärkere Vergrößerung eines ballonförmigen Tumorbezirks (Pfeil) zeigt Abb. 106. Im RM erscheint dieses Gebiet heller als im FM.

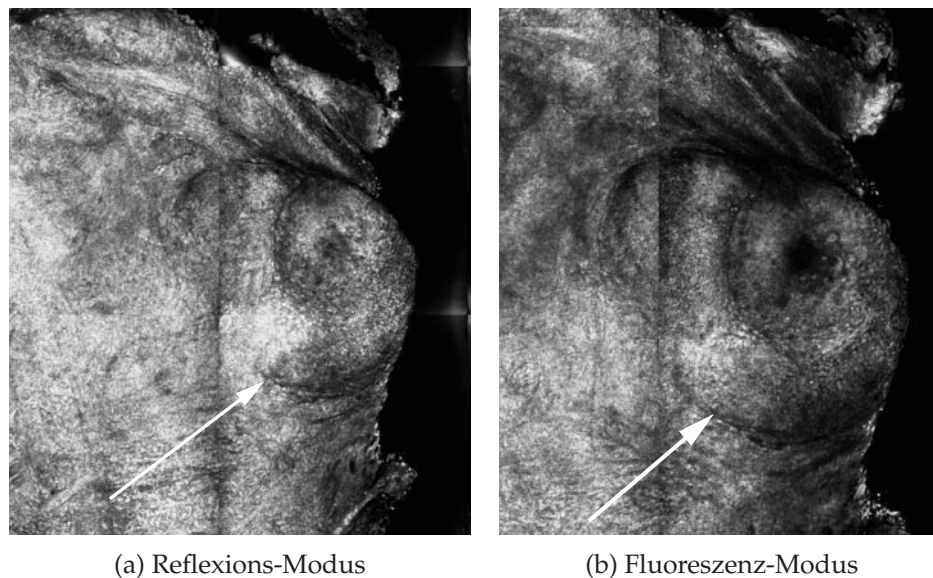
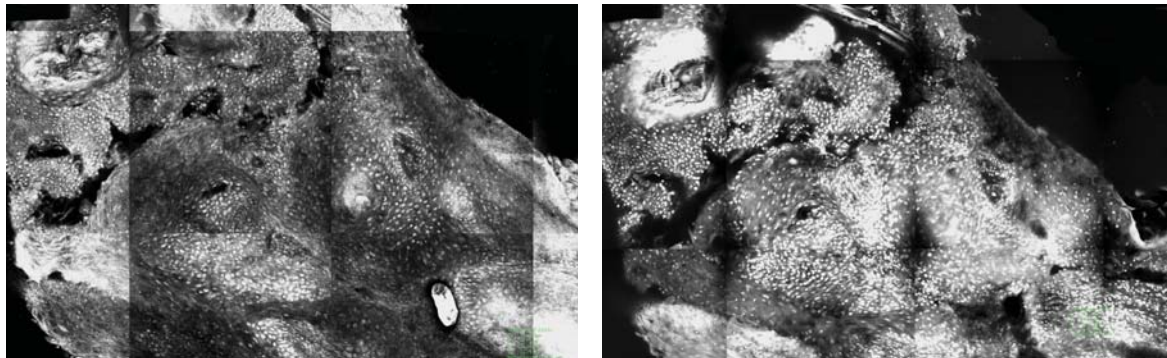


Abbildung 106: Tumorinsel eines Bowen-Karzinoms. Färbung: Acridine Orange

Keratoakanthom

Abbildung 107 zeigt einen Ausschnitt aus einem hochdifferenzierten Keratoakanthom. Das Tumorgewebe ähnelt dem Tumorgewebe des PEK sehr stark. Es lassen sich zahlreiche pleomorphe Keratinozyten mit bizarren Zellkernen erkennen.

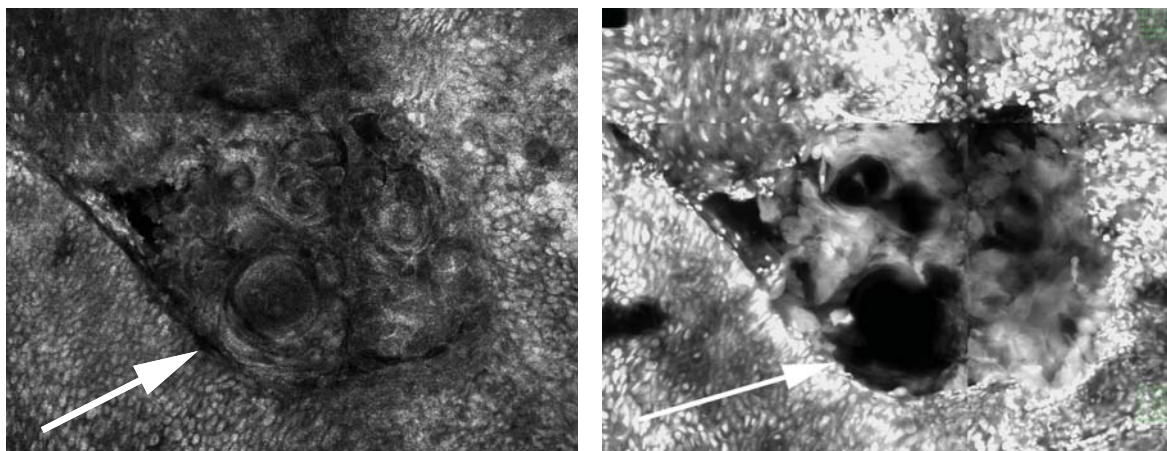


(a) Reflexions-Modus

(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 107: Keratoakanthom. Färbung: Acridine Orange

Charakteristisch für Keratoakanthome ist die Ausbildung zahlreicher Hornperlen (Pfeil). Diese befinden sich im gesamten Tumorgewebe und liegen häufig dicht beisammen (Abb. 108).



(a) Reflexions-Modus

(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 108: Hornperlen eines Keratoakanthoms. Färbung: Acridine Orange

Die zentrale Hornmasse kann in diesem Präparat nicht beobachtet werden, jedoch lassen sich zahlreiche, zu Aggregaten vereinigte Keratinozyten (Pfeil) mit dem gleichen Differenzierungsgrad erkennen, die kurz vor der Verhornung stehen (Abb. 109). Umgeben sind

diese Aggregate von einem entzündlichen Infiltrat.

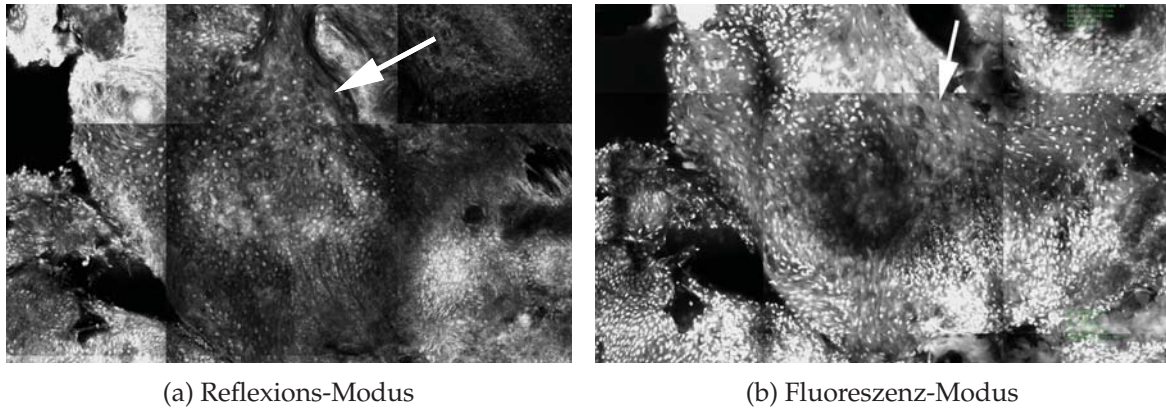
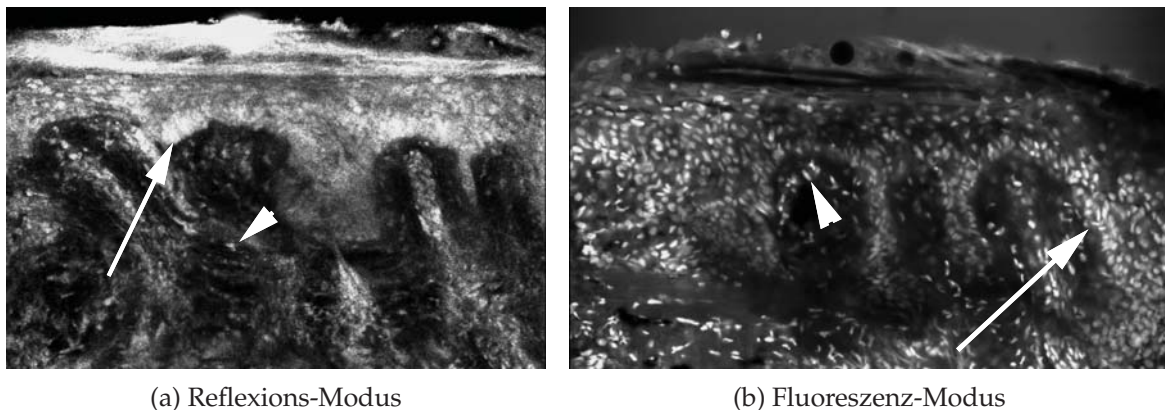


Abbildung 109: Aggregate aus Keratinozyten eines Keratoakanthoms. Färbung: Acridine Orange

5.7.2 Malignes Melanom

In Abb. 110 sind die Epidermis und die Dermis eines MM zu sehen. Typisch für das MM ist ein asymmetrischer Aufbau der Läsion aus atypischen Melanozyten. Asymmetrisch konstruierte Reteleisten, die teilweise horizontal ineinander verschmelzen, können beobachtet werden. Entweder konfluieren die Melanozyten zu Nestern unterschiedlicher Form und Größe oder sie treten als Einzelzellproliferationen auf und wandern innerhalb der Epidermis in die oberflächlichen Schichten. Zell- und Kernpolymorphien sind vorhanden. Im RM präsentieren sich die Tumorzellen als weiße Bereiche innerhalb der Epidermis (Pfeil). Zusätzlich sind innerhalb der Dermis unscharf begrenzte Nester aus atypischen Melanozyten ohne Reifungstendenz zu erkennen. Im FM leuchten die Melanozyten heller als die Keratinozyten und können deshalb sehr gut von ihnen unterschieden werden. Die isolierten Melanophagen (Pfeilspitze) innerhalb der Dermis leuchten hell weiß.



(a) Reflexions-Modus

(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 110: Epidermis und Dermis eines MM. Färbung: Acridine Orange

Abbildung 111 zeigt eine Aufnahme der Epidermis und Dermis eines MM im FM. In einigen Bereichen ist die Epidermis sehr dünn (Pfeilspitzen). Dieses Phänomen wird als „Consumption“ bezeichnet und stellt den Beginn einer Ulzeration dar. Zahlreiche unscharf begrenzte Nester aus weiß erscheinenden Melanozyten sind an der DEJ zu erkennen. Teilweise bestehen zwischen den Nestern aber auch große Abstände und artifizielle Spaltbildungen (kurzer Pfeil) lassen sich beobachten. Klinisch macht sich dieses Phänomen in der Fragilität und Instabilität des Tumorgewebes bemerkbar. Einzelzellproliferationen sind ebenfalls zu beobachten (langer Pfeil).

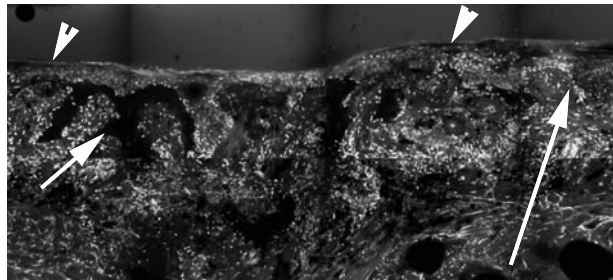


Abbildung 111: Epidermis und Dermis eines MM mit „Consumption“-Phänomen. Färbung: Acridine Orange

Superfiziell spreitendes malignes Melanom

Einen Ausschnitt aus einem Präparat des am häufigsten auftretenden Subtyps des MM, dem superfiziell spreitenden Melanom (SSM), zeigt Abb. 112. Im RM lassen sich die Melanozyten im Bereich der Epidermis nicht so gut von ihrem Hintergrund abgrenzen, da hier kein starker Kontrast vorhanden ist. Durch das dunkelgraue Erscheinungsbild der Dermis lassen sich hier die einzelnen weiß erscheinenden Melanozyten (langer Pfeil) sehr klar differenzieren. Sie sind vergrößert und besitzen bizarre Formen, die von rund bis spindelförmig reichen. Im FM lässt sich unterhalb der Epidermis eine Fibrose feststellen (kurzer Pfeil). Das Bild der Dermis ist sehr unruhig aufgrund der zahlreichen hell leuchtenden Entzündungszellen. Dieses lymphohistiozytäre Infiltrat ist für das SSM typisch. Bei den auffallend hell leuchtenden Zellen in der Dermis handelt es sich um Melanophagen (Pfeilspitzen).

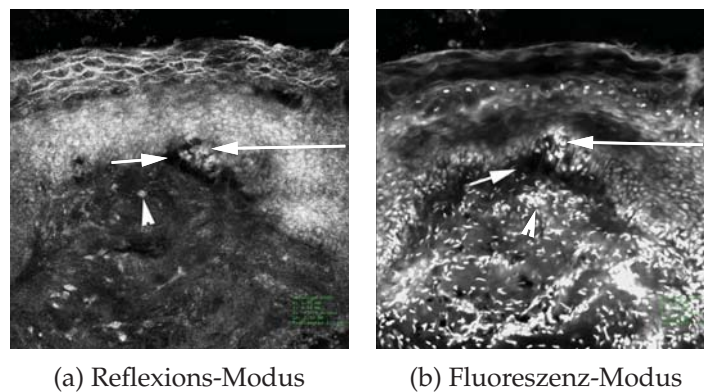


Abbildung 112: Epidermis und obere Dermis eines SSM. Färbung: Acridine Orange

Abbildung 113 präsentiert die unruhige, verwaschene DEJ eines SSM. Im RM sind die hellen Melanozyten und Melanophagen (Pfeil) auf dem dunkelgrauen Hintergrund der Dermis sehr deutlich zu sehen. Die Zellform und -größe ist sehr variabel und stets asymmetrisch. Die Melanozyten zeigen zur Tiefe hin keine Maturationszeichen. Im FM ist die

Grenze zwischen Epidermis und Dermis noch etwas schwieriger festzulegen. Haupteigenschaft dieser Aufnahme sind die hell leuchtenden Zellkerne der Epidermis und der Dermis. Da sowohl die Melanozyten als auch die Entzündungszellen weiß leuchten, ist eine Unterscheidung dieser beiden Zellen innerhalb des lymphohistiozytären Infiltrats schwierig. Zellgröße und -morphologie sind die einzigen Kriterien die hier eine Unterscheidung ermöglichen.

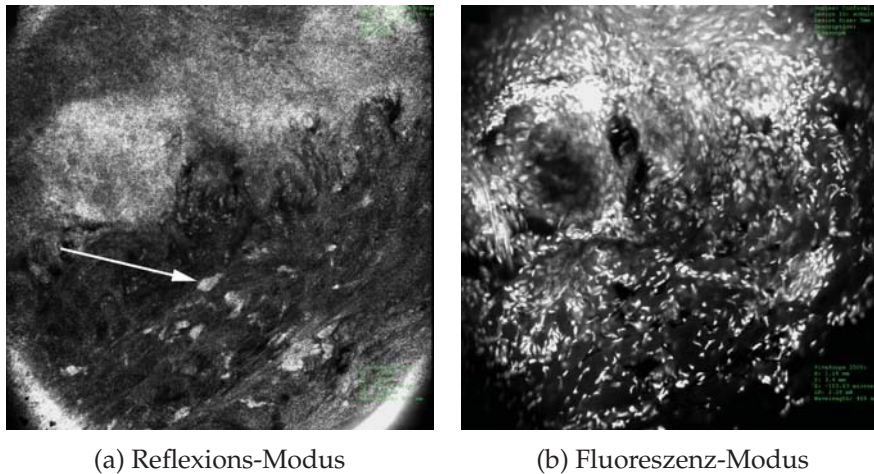


Abbildung 113: DEJ eines SSM. Färbung: Acridine Orange

Die beiden Aufnahmen aus Abb. 114 sind im RM aufgenommen und zeigen einen vergrößerten Ausschnitt des Präparats eines SSM. Die isoliert auftretenden Melanozyten (Pfeile) sind auch hier gut zu erkennen. Bei dieser Läsion treten sie lediglich in der Epidermis und den oberen Schichten der Dermis auf, da eine lange horizontale Wachstumsphase für diesen Subtyp des MM typisch ist.

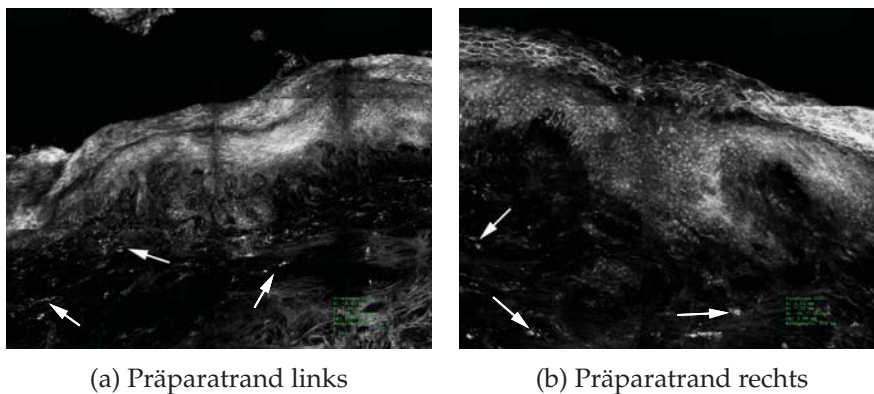


Abbildung 114: Melanozyten eines SSM. Färbung: Acridine Orange

Noduläres malignes Melanom

Bei der Aufnahme des Präparats aus Abb. 115 handelt es sich um ein noduläres MM. Da die Tumordicke dieser Läsion 17mm beträgt, ist von einem sehr fortgeschrittenen Stadium auszugehen. Unterhalb der hellgrauen Epidermis zeigt sich eine unruhige Dermis die ihre strukturellen Merkmale vollständig verloren hat. Die pleomorphen, atypischen, weißen Tumorzellen sind in dichten asymmetrischen Nestern gruppiert und durchsetzen die Dermis vollständig. Im FM leuchtet die gesamte Dermis weiß und beherbergt unzählige Tumorzellen und zahlreiche kleinere Entzündungszellen, die ein dichtes lymphohistiozytäres Infiltrat bilden.

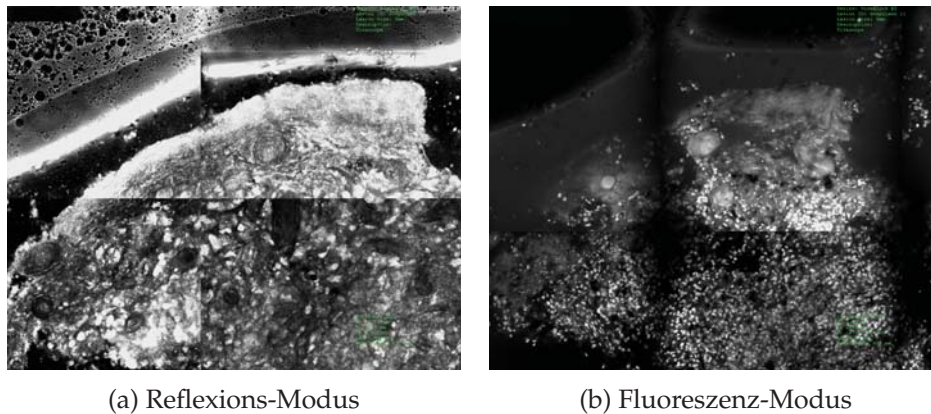


Abbildung 115: Epidermis und Dermis eines nodulären MM. Färbung: Acridine Orange

Abbildung 116 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus der vorherigen Aufnahme. Die für das MM typische Wanderung der Melanozyten von den unteren Epidermisschichten in die oberen kann bei dieser Aufnahme beobachtet werden (Pfeilspitze).

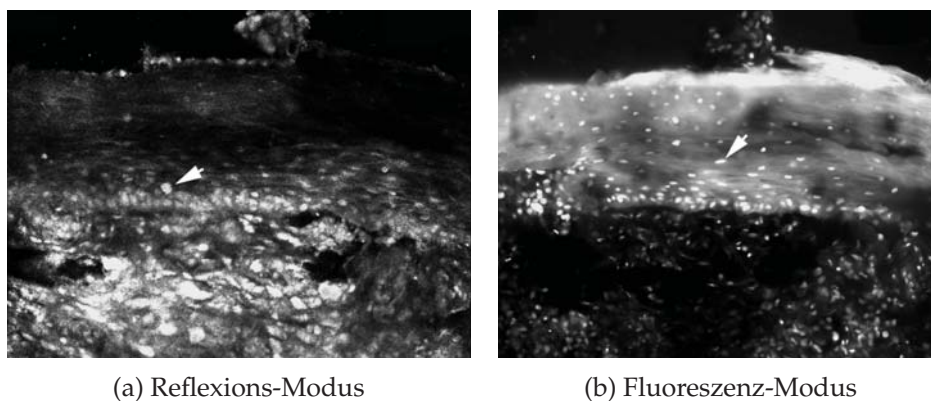
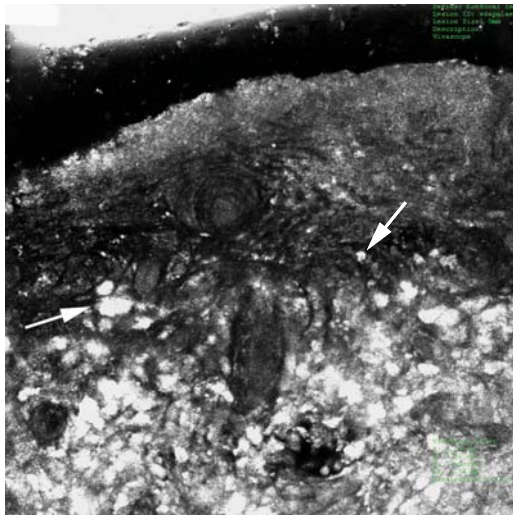
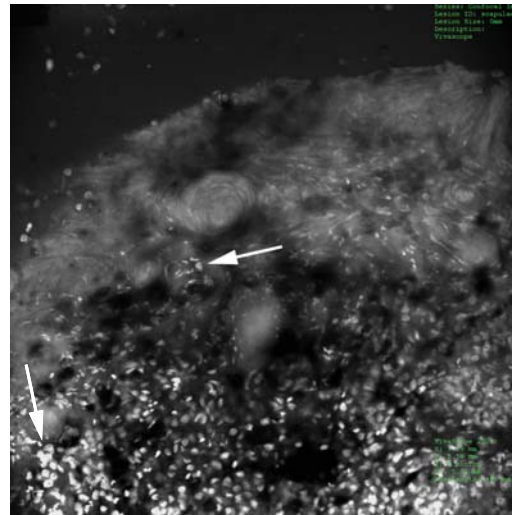


Abbildung 116: Epidermis eines nodulären MM. Färbung: Acridine Orange

Einen weiteren Ausschnitt des Präparats zeigt die Aufnahme aus Abb. 117. Die regelmäßige Schichtung der Epidermis ist vollständig aufgehoben. Im RM lassen sich einzelne weiße Melanozyten (Pfeil) in allen Bereichen der Epidermis erkennen. Die Dermis zeigt zahlreiche weiße, rasenartige melanozytäre Nester die so dicht beieinander liegen, dass eine Unterscheidung der einzelnen Nester kaum möglich ist. Im FM ist die Epidermis homogen mittelgrau mit einzelnen weißen Melanozyten (Pfeil). Die Dermis besitzt ein dichtes lymphohistiozytäres Infiltrat, das von zahlreichen Tumorzellen durchsetzt ist.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

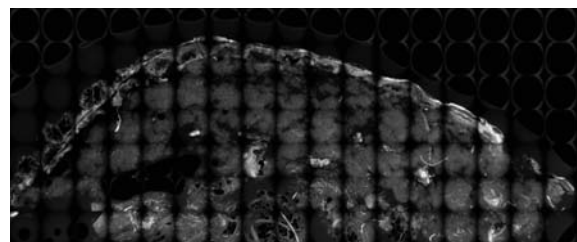
Abbildung 117: Vergrößerter Ausschnitt eines nodulären MM. Färbung: Acridine Orange

Spitzoides malignes Melanom

Abbildung 118 zeigt die Übersichtsaufnahme eines spitzoiden MM. Die Läsion zeigt eine akanthotische Epidermis mit Hyperplasie der Reteleisten. Der Aufbau ist symmetrisch, aber eine scharfe Abgrenzung ist seitlich nicht möglich.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 118: Spitzoides malignes Melanom. Färbung: Acridine Orange

Zwei vergrößerte Ausschnitte des spitzoiden MM werden in Abb. 119 im RM gezeigt. Die gesamte Läsion wirkt sehr unruhig. Die Reteleisten der Epidermis sind in einigen Bereichen verlängert und laufen häufig sehr spitz zu (kurzer Pfeil). Einzelne weiße Melanozyten sind in allen Schichten der Epidermis und in der Dermis zu erkennen (Pfeilspitze). Auch das charakteristische pagetoide Aufsteigen der Tumorzellen in der Epidermis kann festgestellt werden (langer Pfeil).

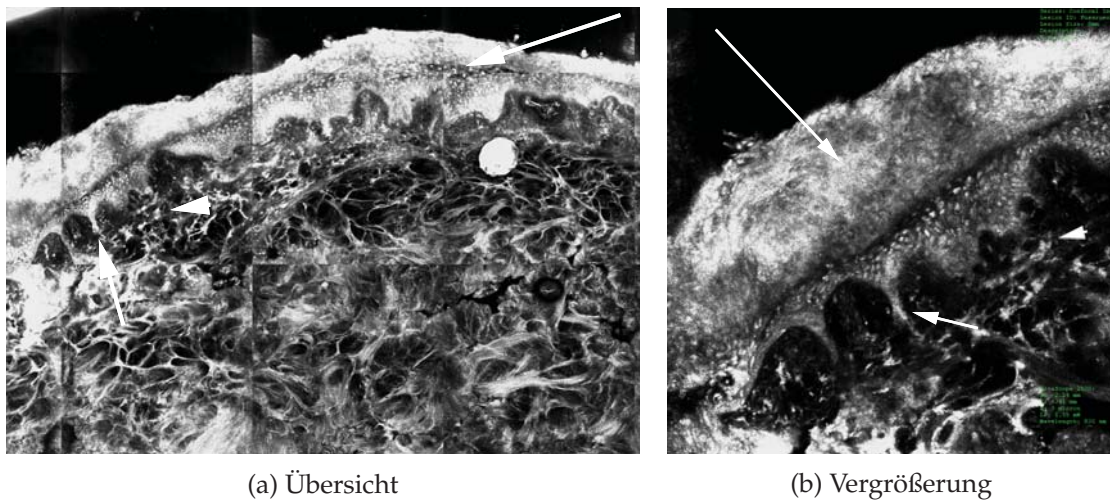


Abbildung 119: Epidermis und Dermis eines spitzoiden MM. Färbung: Acridine Orange

Ein weiterer vergrößerter Ausschnitt dieses Präparats wird in Abb. 120 dargestellt. Die einzelnen, atypischen, weiß leuchtenden Melanozyten, die durch die einzelnen Schichten der Epidermis und Dermis wandern, können hier besonders gut erkannt werden (Pfeile).

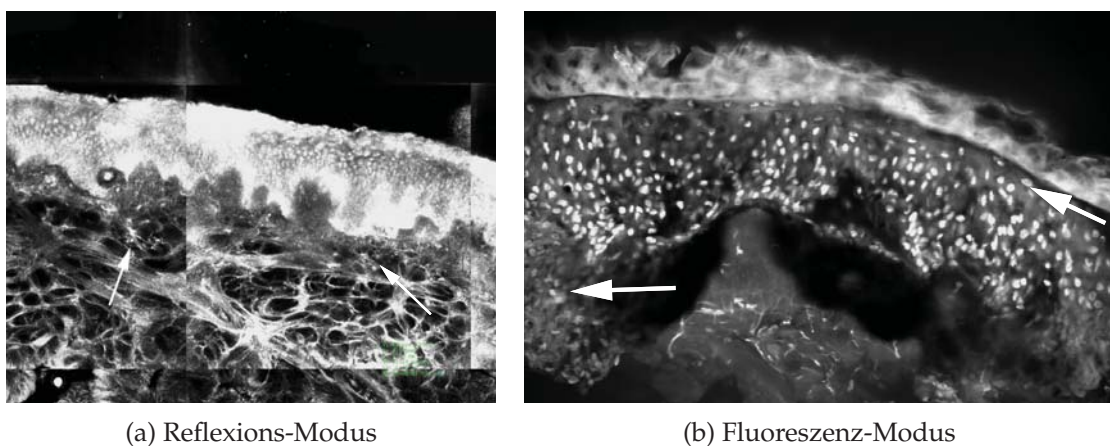


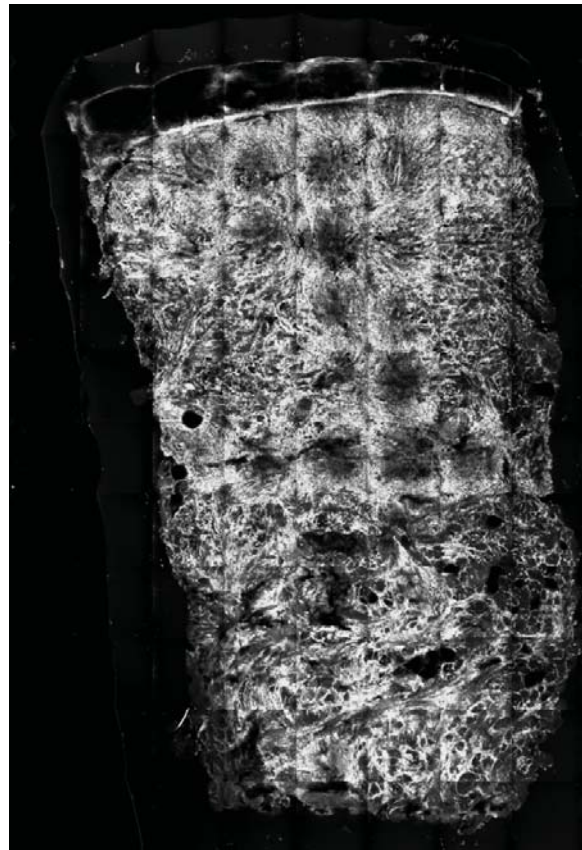
Abbildung 120: Melanozyten eines spitzoiden MM im. Färbung: Acridine Orange

Hautmetastase eines malignen Melanoms

Die Übersichtsaufnahme eines Präparats einer Hautmetastase eines MM wird in Abb. 121 gezeigt. Die Epidermis ist hier nicht ulzeriert. Die gesamte Dermis ist von Tumorgewebe durchsetzt. Im Zentrum des Präparats besitzt das Tumorgewebe eine faserartige Struktur und hat im RM eine homogene, mittelgraue Farbe und im FM leuchtet es weiß.



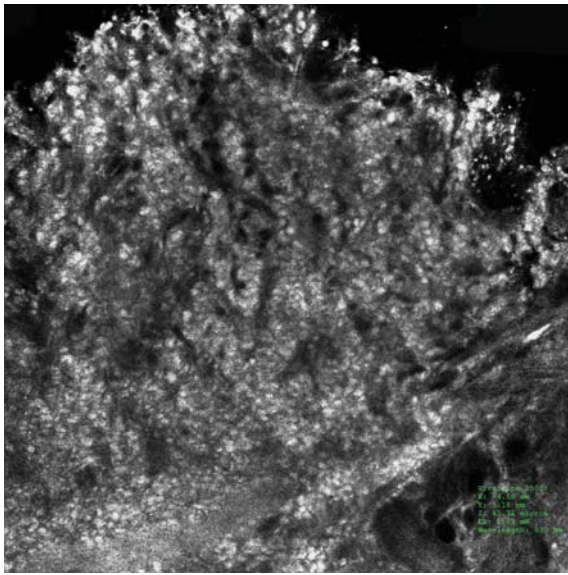
(a) Reflexions-Modus



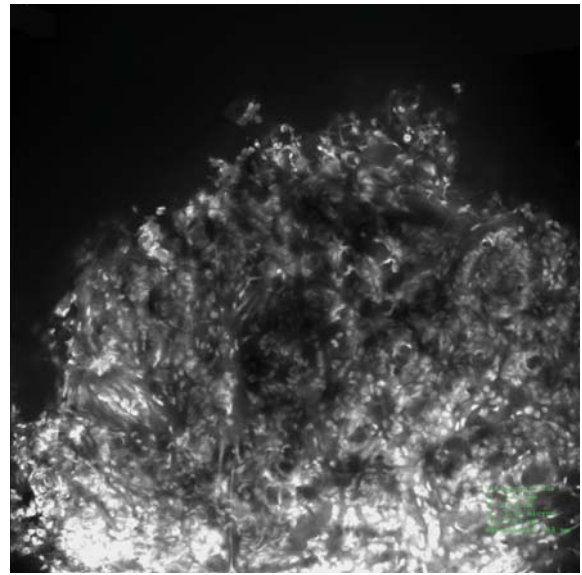
(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 121: Übersichtsaufnahme einer Hautmetastase eines MM. Färbung: Acridine Orange

Abbildung 122 zeigt einen Ausschnitt aus einem Präparat einer Hautmetastase eines MM. Im RM und im FM sind die Tumorzellen weiß oder hellgrau. Charakteristisch ist, dass die atypischen Tumorzellen sehr groß sind und ebenfalls sehr große Kerne besitzen. Entscheidend ist jedoch, dass sie im Gegensatz zu den Zellen der Primärtumoren, monomorph sind. Physiologische Strukturen sind hier nicht mehr zu erkennen.



(a) Reflexions-Modus



(b) Fluoreszenz-Modus

Abbildung 122: Tumorgewebe einer Hautmetastase des MM. Färbung: Acridine Orange

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Insgesamt wurden in unserer Studie 252 Präparate von 152 Patienten mit Hilfe des ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskops untersucht. Von jeder Läsion wurden sowohl im RM als auch im FM Aufnahmen angefertigt, die jeweils einander gegenübergestellt wurden. Häufig wurden auch mehrere Schnitte aus einem Präparat gewonnen und untersucht. Charakteristische Merkmale, welche die Histologie zur Diagnosebestimmung nutzt, wurden herausgearbeitet und beschrieben. In den Aufnahmen im RM und FM konnten unterschiedliche Merkmale entdeckt werden. So war es für die korrekte Beurteilung einer Läsion hilfreich Aufnahmen in beiden Modi zu untersuchen.

Der erste Teil der Studie beinhaltete die Untersuchung von Präparaten der gesunden Haut, sowie die Aufstellung einer Übersicht von möglichen auftretenden Artefakten. Die einzelnen Schichten der Haut, ihre Anhangsgebilde, Gefäße, Nerven, sowie Fett- und Muskelgewebe wurden dargestellt und detailliert beschrieben. Die korrekte Interpretation aller Merkmale der gesunden Haut war die Voraussetzung für eine Beurteilung von pathologischen gutartigen und bösartigen Veränderungen der Haut. In der Studie von [Karen et al., 2009] wurden neben BZK ebenfalls Präparate gesunder Haut untersucht, jedoch wurden die morphologischen Eigenschaften nicht so detailliert beschrieben wie in unserer Studie.

Im zweiten Teil unserer Studie beschäftigten wir uns mit unterschiedlichen Hautveränderungen. Dazu zählten gutartige Veränderungen, bösartige Veränderungen und Präkanzerosen. Die Auswertung der konfokalen Bilder und der histologischen Bilder führte fast immer zur gleichen Diagnose. Es existieren bereits zahlreiche Studien in denen konfokale Aufnahmen von BZK mit ihren histologischen Aufnahmen verglichen wurden [Gareau et al., 2009a], [Karen et al., 2009], [Longo et al., 2013], [Ziefle et al., 2010], [Bennàssar et al., 2013], [Longo et al., 2014], [Patel et al., 2007], [Gareau et al., 2009b], [Gareau et al., 2009a], [Bennàssar et al., 2012]. Alle diese Studien kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die morphologische Übereinstimmung mit der Histologie hoch ist. Allerdings wurden nur in wenigen Studien Aufnahmen im RM und im FM gegenübergestellt [Al-Arashi et al., 2007], [Bennàssar et al., 2014]. [Rajadhyaksha et al., 2001] und [Chung et al., 2004] verglichen Aufnahmen der KLM und der Histologie des PEK. Auch wenn zahlreiche Studien über melanozytäre Läsionen in der in-vivo KLM existieren, ist die Zahl der Studien mit dem ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskop klein. [Debarbieux et al., 2012] führte eine Studie zur Untersuchung des MM der Nagelplatte durch.

Mit unserer Studie konnten wir belegen, dass sich bei der optischen Auswertung der konfokalen Bilder und der histologischen Präparate große Übereinstimmungen ergeben.

Merkmale die in der Histologie zur Diagnosefindung genutzt werden, können in den konfokalen Bildern wieder gefunden werden. Entscheidend jedoch ist, wie auch in der konventionellen Histologie, eine korrekte Interpretation der konfokalen Bilder.

Um das ex-vivo konfokale Laserscanmikroskop vollständig in den klinischen Alltag einbinden zu können, unterstützend oder stellvertretend zur konventionellen Histologie, sind jedoch weitere Studien erforderlich. Die Studien sollten sich über längere Zeiträume erstrecken und eine größere Anzahl von Präparaten untersuchen. Des Weiteren sollten zusätzlich zu jeder Läsion ebenfalls dermatoskopische Bilder, sowie Aufnahmen mit dem in-vivo konfokalen Laserscanmikroskop angefertigt werden, um die ex-vivo KLM auch mit diesen beiden Diagnostikmethoden vergleichen zu können. Für die Zukunft wäre es wünschenswert für die Diagnose der verschiedenen Hautveränderungen die genauen Sensitivitäten und Spezifitäten für die ex-vivo KLM zu ermitteln.

6.2 Diskussion der Methoden

In dieser Studie waren am gesamten Behandlungs- und Diagnosevorgang drei Behandler beteiligt. Dazu zählten der Operateur, ein Behandler der die Präparate vorbereitete, die ex-vivo konfokalen Aufnahmen anfertigte und beurteilte und der Histologe, der die jeweiligen Verdachtsdiagnosen der Präparate histologisch verifizierte. Die Beurteilung der histologischen Aufnahmen und der ex-vivo konfokalen Aufnahmen erfolgte erneut durch den Operateur. So wurden die ex-vivo konfokalen Aufnahmen von zwei unabhängigen Personen getrennt beurteilt.

Mit dem aktuellen ex-vivo Gerät konnten Gewebeproben mit einer Größe von maximal 20,8x20,8mm gescannt werden. Dies ist im Vergleich zu den maximal scannbaren Präparatgrößen der Vorläufer-Geräte ein deutlicher Fortschritt. In einer früheren Studie von [Gareau et al., 2009a] lag die maximal scannbare Fläche bei einer Größe von 12x12mm. Trotzdem stellte die Begrenzung auf 20,8x20,8mm ein Problem bei den Läsionen dar, welche die Größe dieser Fläche überschritten.

Eine weitere Vergrößerung der Scanfläche mit einer Vergrößerung des Bildfeldes und einer größeren Anzahl von Einzelaufnahmen wäre für eine zukünftige Weiterentwicklung vorteilhaft. Wie [Larson et al., 2013a] schon beschrieben haben, muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Scannen größerer Präparate auch einen größeren Zeitaufwand und die Notwendigkeit der Bereitstellung eines größeren Speicherplatzes mit sich bringt.

Eine Fixierung des Gewebes war für die Untersuchung mit dem konfokalen Laserscanmikroskop nicht notwendig. Wurde das Präparat in Formalin fixiert, führte dies sogar zu einer starken Verschlechterung der Bildqualität. Problematisch war jedoch, dass beim Zuschneiden des Präparats mit dem Skalpell das Gewebe leicht zerstört werden konnte. Aufgrund der fehlenden Fixierung war ein glatter Schnitt mit dem Skalpell, ohne Abzugleiten oder das Gewebe stark zu drücken häufig nicht möglich. [Karen et al., 2009] untersuchten

Präparate von BZK nachdem die konventionelle histologische Untersuchung bereits stattgefunden hatte. Die Präparate wurden mit Stickstoff fixiert, geschnitten und nach der histologischen Untersuchung aufgetaut. In dieser Studie wurde bereits darauf hingewiesen, dass bei dieser Methode Präparatscheiben gewonnen wurden, die sehr exakt geschnitten waren. Jedoch verursachte diese Vorarbeit einen zu großen Aufwand und zu hohe Kosten.

Die Entwicklung einer Fixierungsmethode, die ein Schneiden des Präparats erleichtert, die Aufnahmen des konfokalen Laserscanmikroskops nicht beeinflusst und schnell und einfach durchführbar ist, wäre ein großer Fortschritt.

Ebenso war es problematisch beim Schneiden der Präparate mit dem Skalpell die geeignete Stärke der Scheibe festzulegen. Wird das Präparat zu dick geschnitten, führt dies später zu einem Problem bei der Fixierung der Objektträger im Mikroskop. Wird es jedoch zu dünn geschnitten, kann das Gewebe zerstört werden. Außerdem kann per Augenmaß der richtige Winkel zwischen Skalpell und Hautoberfläche nur schwer abgeschätzt werden. Beträgt dieser nicht 90° , so wird die Epidermis und die Dermis quer angeschnitten, was zu einer erschwerten Beurteilung der Aufnahmen führt, da Epidermis und Dermis nicht vertikal abgebildet werden.

Ein weiteres technisches Problem entstand beim Schneiden von sehr schmalen Präparaten, die jedoch bis tief in die Dermis oder Subkutis reichten. Diese Präparate mussten auf eine Seite gelegt und dann horizontal geschnitten werden. Dies führte zu einer erhöhten Fehlergefahr bei der Ausrichtung der Schnittebene.

Sehr wichtig war es darauf zu achten, dass die Stärke der Präparatscheibe nicht zu dick wurde. Überschritten die beiden Objektträger mit dem in „Sandwich-Technik“ fixierten Präparat eine bestimmte Dicke, so konnten sie nicht in der Haltevorrichtung des Mikroskops befestigt werden. Das Scannen war also nicht möglich.

Eine Optimierung des Präparatschnittes, könnte durch eine Automatisierung des Schneidevorgangs erzielt werden. So könnten die Präparatstärke und die Ausrichtung des Skalpells im Verhältnis zur Hautoberfläche genau festgelegt werden. Hier wären Weiterentwicklungen des ex-vivo Geräts wünschenswert.

Das Färben der Präparate erfolgte innerhalb von zwei Minuten und gelang problemlos. Die Konzentration der Zitronensäure von 10% führte zu guten Ergebnissen bei den konfokalen Aufnahmen. [Patel et al., 2007] und [Gareau et al., 2009b] belegten schon in früheren Studien, dass für Säurekonzentrationen von 5% bis 10% eine Einwirkzeit von 30 Sekunden zu optimalen Ergebnissen führt. In unserer Studie stellte sich eine Einwirkzeit von 30 Sekunden ebenfalls als optimal heraus. Dass Acridine Orange in einer Konzentration von 1,0mM bei einer Färbezeit von 20 Sekunden zu den besten Ergebnissen führt wurde von [Gareau et al., 2008] bestätigt. [Bini et al., 2011] beschrieben in ihrer Studie, dass eine Konzentration von 0,6mM ausreichend sei und so unnötige Farbüberschüsse vermieden werden könnten. In unserer Studie befolgten wir ebenfalls dieses Färbeprotokoll mit einem zufriedenstellenden Ergebnis.

Als Fluoreszenzfarbstoffe standen Acridine Orange und Fluorescein zur Verfügung, die

beide selektiv bestimmte Bestandteile der Zellen anfärbten. Zahlreiche andere Studien zeigten, dass vor allem Acridine Orange sehr gut geeignet ist um Tumorgewebe anzufärben und im FM darzustellen. Jedoch mangelte es an alternativen Farbstoffen, die andere Zellkomponenten oder Gewebestrukturen anfärben. [Ziefle et al., 2010] beispielsweise verwendeten in ihrer Studie Toulidineblau zur Färbung der Präparate.

Zukünftige Studien sollten sich mit der Prüfung neuer Fluoreszenzfarbstoffe auseinandersetzen. Beispielsweise wäre ein Farbstoff der selektiv an Keratin bindet, bei der Diagnose von AK, M.Bowen und PEK sehr hilfreich, da Anomalien der Verhornung dargestellt werden könnten. Farbstoffe die spezifisch bestimmte Strukturen oder Zellen färben, wie beispielsweise das Kollagenfasern färbende Säurefuchsin in der Histologie, wären ebenfalls von großem Nutzen. Bis heute ist kein Farbstoff bekannt der zu 100% tumorspezifisch ist [Al-Arashi et al., 2007]. Weitere Studien sollten außerdem den Einsatz von spezifischen Antikörpern, wie in der Immunhistochemie, zur Darstellung bestimmter Strukturen untersuchen.

Die zugeschnittenen, gefärbten Präparate wurden zwischen zwei Objektträgern fixiert. Da Unebenheiten in der Präparatoberfläche unvermeidbar waren, musste die zu scannende Seite durch das Zusammendrücken der beiden Objektträger in eine zweidimensionale Ebene gebracht werden. Bei diesem Komprimieren des Gewebes rutschte das Präparat häufig aus der vorgesehenen Markierung heraus. Das verursachte einen erhöhten Zeitaufwand, da das Präparat zunächst neu positioniert werden musste, um es anschließend erneut zu fixieren.

In der Fixierung des vorbereiteten Präparats bedarf es weiterer Verbesserung. Optimal wäre die Entwicklung einer Konstruktion, die ein sicheres Positionieren und eine leichte Komprimierung des Gewebes erlaubt. Außerdem sollte der Fixierungsvorgang mit weniger nicht wiederverwendbaren Verbrauchsmaterialien, wie zum Beispiel dem Haftsilikon auskommen können.

Unser ex-vivo konfokales Laserscanmikroskop benötigte für das Scannen der maximalen Fläche von 20,8x20,8mm insgesamt sieben Minuten. Für kleinere Flächen entsprechend kürzer. Diese benötigte Zeit stellt schon einen großen Fortschritt im Vergleich zu der benötigten Zeit der konfokalen Laserscanmikroskope älterer Generationen dar. Das konfokale Laserscanmikroskop aus der Studie von [Gareau et al., 2009a] benötigte für den Scanvorgang einer Fläche von 12x12mm noch neun Minuten. Es gibt jedoch auch eine neuere Methode des „Mosaicings“, das sogenannte „strip mosaicing“. Bei dieser von [Larson et al., 2013a] und [Abeytunge et al., 2011] verwendeten Methode werden anstatt quadratischer Einzelbilder, streifenförmige Einzelaufnahmen aneinander gereiht. Da die Software bei dieser Art der Aneinanderreihung weniger Zeit benötigt, wird der gesamte Scanvorgang beschleunigt. Der gesamte Scanvorgang einer Fläche von 10x10mm erfolgte bei dem konfokalen Laserscanmikroskop der Studie von [Abeytunge et al., 2011] innerhalb von drei Minuten.

Die Mikroskophersteller arbeiten daran den Scanvorgang noch stärker zu verkürzen.

Dies ist notwendig um ein effizientes Arbeiten im klinischen Alltag zu ermöglichen. Zum einen kann dies durch Verbesserungen der Software bisheriger Scanmethoden erfolgen, zum anderen kann die Entwicklung neuer Methoden einen Zeitvorteil mit sich bringen.

Die Austrocknung des Gewebes ist ein unerwünschter Nebeneffekt einer langen Scanzeit. Durch die hohe Energie des Laserlichts, kommt es zu einer Wärmeentwicklung innerhalb des Gewebes, die zur Verdampfung der Gewebeflüssigkeit sowie des Farbstoffs führt. Dadurch wird das Präparat für eventuelle weitere Untersuchungen unbrauchbar.

Da eine Verringerung der Laserenergie nicht möglich ist, wäre die Möglichkeit einer Kühlung des Gewebes eine Option zur Lösung des Problems.

Die Qualität der konfokalen Aufnahmen ist insgesamt als sehr gut zu bewerten. Die einzelnen Strukturen der Haut konnten sehr gut identifiziert werden. Die Auflösung der Bilder ist exzellent. Die größte Abweichung zu den histologischen Bildern ist, dass die konfokalen Aufnahmen in Graustufen dargestellt werden, während die histologischen HE-Aufnahmen blau-pinke Farbtöne besitzen. Dies erschwert häufig die Interpretation, besonders für unerfahrene Untersucher. Eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Strukturen ist in manchen Fällen nicht möglich.

Mit diesem Problem beschäftigten sich bereits [Bini et al., 2011]. Sie führten eine Studie zur Prüfung einer Software durch, die es ermöglichte die konfokalen Aufnahmen digital zu färben. Zunächst wurden die RGB-Werte histologischer Bilder (HE-Färbung) analysiert und anschließend auf die konfokalen Aufnahmen übersetzt. So wichen die Farbtöne der histologischen Bilder nur minimal von denen der digital gefärbten konfokalen Bilder ab. Eine weitere Optimierung dieser digitalen Färbung und das Verwenden weiterer Farbtöne, könnte in Zukunft für die Interpretation der konfokalen Aufnahmen eine große Vereinfachung bedeuten.

Die Speicherung der Aufnahmen erfolgte im BMP-Format. Die durchschnittliche Größe einer Aufnahme eines *VivaBlock*® betrug 90 MB. Sollte die KLM zukünftig routinemäßig zur Beurteilung von Patientenmaterial eingesetzt werden, besteht die rechtliche Pflicht die Aufnahmen eines Patienten für 15 Jahre zu speichern. Momentan wäre dies problematisch, da die Aufnahmen einen sehr großen Speicherplatz benötigen. Die Bereitstellung von Festplatten mit entsprechendem Speicherplatz verursacht sehr hohe Kosten. Die Entwicklung einer Software, welche die zu archivierenden Bilder komprimiert ist daher unumgänglich.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

Zunächst wurden in unserer Studie Präparate der gesunden Haut untersucht um die physiologischen Strukturen der Haut richtig interpretieren zu können. Die einzelnen Schichten der Epidermis und der Dermis, sowie die DEJ ließen sich leicht differenzieren. Kernhaltige Keratinozyten zeigten sich deutlich im FM und im RM. Melanozyten und Lymphozyten konnten im FM besser erkannt werden als im RM. Ebenso bildeten die Fibroblasten

und die kollagenen und elastischen Fasern der Dermis im FM einen stärkeren Kontrast zu ihrer Umgebung. Die Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Talgdrüsen und Schweißdrüsen bildeten in den konfokalen Aufnahmen klar abgegrenzte Strukturen, die im RM noch etwas deutlicher als im FM dargestellt wurden. Im FM bildete die Aufnahme der Talgdrüsen eine Ausnahme. Hier erschienen sie häufig sehr dunkel und unklar von ihrer Umgebung abgegrenzt. Ebenfalls gelang es Fettgewebe und Muskelgewebe abzubilden. Diese beiden Gewebetypen ließen sich klar definieren. Ein entscheidender Vorteil der KLM gegenüber der Histologie liegt in der besseren Darstellung des Fettgewebes, da es nicht wie bei der Fixierung mit Formalin herausgewaschen wird. Auch Nervenfasern und Gefäße ließen sich im RM und im FM problemlos darstellen. [Karen et al., 2009] untersuchten neben BZK auch Präparate der gesunden Haut und kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass große morphologische Ähnlichkeiten zwischen den konfokalen Aufnahmen und der Histologie bestehen. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Merkmale wie in unserer Studie, erfolgte jedoch bisher noch nie. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit konnte eine Beschreibung von gesunder Haut in der KLM im Vergleich zur Histologie kürzlich veröffentlicht werden [Hartmann et al., 2015b].

[White et al., 2004] beschrieben schon, dass durch die KLM zwar Artefakte, welche in den histologischen Bildern auftreten vermieden werden können, jedoch ist eine Auseinandersetzung mit Artefakten die speziell in der KLM auftreten unausweichlich. Deshalb erstellten wir im Rahmen unserer Studie eine Liste von den möglichen Artefakten und beschrieben Merkmale, mit Hilfe derer sie erkannt werden können. Das Vorhandensein von Silikon oder Fasern der Kompresse im Präparat kann vom Untersucher leicht erkannt werden, da sich diese Strukturen im FM und im RM abbilden. Wird die falsche Seite des Präparats gescannt, das Präparat zu dick geschnitten, ein gefrorenes Präparat gescannt oder vergessen das Gel aufzutragen entstehen verschwommene, unscharfe konfokale Aufnahmen. Werden mit Formalin fixierte Präparate gescannt, so ist eine Darstellung des Gewebes im FM nicht möglich. In den Aufnahmen von ausgetrockneten Präparaten sind Hohlräume zu erkennen, die aufgrund der verdampften Flüssigkeit entstehen. Da fast alle Artefakte durch Fehler in der Präparatvorbereitung oder während des Scanvorgangs entstehen und diese durch den Behandler verursacht werden, können sie durch das Einhalten bestimmter Regeln vermieden werden. Daraus geht hervor, dass schwer zu beeinflussende Parameter, wie die Stärke des Präparats die häufigste Ursache für Artefakte darstellen. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit bezüglich möglicher Artefakte konnten wir kürzlich in einem internationalen Journal veröffentlichen. [Hartmann et al., 2015b] Nach dem Erlernen einer korrekten Interpretation der Aufnahmen gesunder Haut, sowie dem Erwerb der Kenntnis von möglichen auftretenden Artefakten, konnten anschließend Präparate unterschiedlicher Hautveränderungen untersucht werden.

In den Aufnahmen der *Verruca vulgaris*, des *Condyloma acuminatum* und des *Molluscum contagiosum* konnten die gleichen Merkmale wiedergefunden werden, die in der Histologie zum korrekten Befund führen. Die Veränderungen in der Epidermis einschließlich der

Koilozyten konnten bei allen drei Veränderungen festgestellt werden. Die Aufnahme der *Verruca seborrhoica* entsprach dem typischen histologischen Bild in Graustufen. Narbengewebe konnte in beiden Modi gut von gesunder, unveränderter Haut abgegrenzt werden. Beim Lipom stellten sich die einzelnen Fettvakuolen, die an den Rand gedrückten Zellkerne und die interzellulären Septen deutlich dar. Der Vorteil der KLM gegenüber der Histologie liegt bei dieser Läsion darin, dass das Fettgewebe bei der Gewebepreparation für die KLM nicht verändert oder herausgewaschen wurde. Die Aufnahmen des Fibroms und des Neurofibroms zeigten ebenfalls sehr große Ähnlichkeit zu den histologischen Bildern.

Für gutartige Hautveränderung ist die Verkürzung der Zeit bis zur sicheren, postoperativen Diagnose nicht so bedeutend wie bei bösartigen Hautveränderungen, da in der Regel keine weiteren Operationen erfolgen müssen. Damit die KLM jedoch die konventionelle Histologie einmal vollständig ersetzen kann, ist es jedoch unausweichlich auch diese Läsionen beurteilen zu können. Aus diesem Grund sind weitere Studien notwendig, die sich mit gutartigen Veränderungen auseinandersetzen.

Besonders interessant waren die Aufnahmen der gutartigen melanozytären Hautveränderungen, da diese bisher noch nicht mit dem ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskop untersucht wurden. Die Ergebnisse waren sehr zufriedenstellend. Nävi vom Junctions- und Compoundtyp sowie dermale Nävi konnten gut unterschieden werden, da die melanozytären Nester durch ihre weiß leuchtende Farbe leicht zu erkennen und zu lokalisieren waren. Die verlängerten Reteleisten prägten die Läsionen. Klare Abgrenzungen der Läsionen zu ihrer Umgebung waren stets vorhanden. Weitere Untersuchungen melanozytärer Läsionen sind unbedingt notwendig, da sie die wichtigste Differentialdiagnose zum MM darstellen. Nur mit genauer Kenntnis der Eigenschaften kann zwischen gutartigen und bösartigen Läsionen differenziert werden. Es sollte eine Zusammenstellung signifikanter Merkmale erfolgen, die als Leitfaden für die richtige Diagnosefindung dient. Von besonders großem Nutzen für die sichere Identifizierung von Melanozyten in den konfokalen Aufnahmen, wäre die Möglichkeit der Darstellung der Melanozyten mit Hilfe von melanozytären Markern. In der Histologie ist dies bereits möglich mit Hilfe von Melan A, S-100 und HMB-45. Ähnliche Marker sollten für die KLM gefunden werden.

Auch die Vorstufen der malignen Läsionen wurden eingehend untersucht. Bei der AK können die Veränderungen der Epidermis besonders gut im FM erkannt werden, da die hell leuchtenden Zellkerne im schwarzen *Stratum corneum* besonders auffallen. Die Unregelmäßigkeiten des *Stratum basale* stellen sich in beiden Modi deutlich dar. Beim M. Bowen waren die Veränderungen innerhalb der gesamten Epidermis ebenfalls gut sichtbar.

In unserer Studie zeigten wir Aufnahmen von den verschiedenen Subtypen des BZK. Das noduläre BZK war stets gut zu erkennen und leicht zu klassifizieren. Sowohl im RM als auch im FM zeigten sich klar abgegrenzte weiß leuchtende Tumorinseln. Das sklerodermiforme BZK ließ sich im FM besser darstellen, da die schmalen hellen Tumorstränge hier einen stärkeren Kontrast zur umliegenden Dermis bildeten als im RM. Das Gleiche

galt für das mikronoduläre BZK. Das oberflächliche BZK konnte in beiden Modi nur bei sehr genauer Betrachtung sicher erkannt werden. Sehr kleine Läsionen grenzen sich nur schwach von der ebenfalls hellen Epidermis ab. Das zystische BZK war aufgrund der typischen zystischen Hohlräume im RM und FM leicht zu diagnostizieren.

Es wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt, die sich mit der Eignung des konfokalen Laserscanmikroskops für die Untersuchung von BZK beschäftigten. [Rajadhyaksha et al., 2001] und [Chung et al., 2004] untersuchten Präparate von BZK im RM und stellten, genau wie wir, eine große morphologische Übereinstimmung mit der Histologie fest. Jedoch ergab diese Studie, dass sehr kleine Läsionen, vor allem des sklerodermiformen und infiltrativen Subtyps, häufig nicht erkannt werden können, da die im RM hell leuchtende Dermis keinen Kontrast zu den kleinen, hellen Tumorinseln und -strängen bildet. In den Aufnahmen im RM führten Talgdrüsen manchmal zu einer Fehldiagnose, da sie mit einer Tumorinsel verwechselt wurden. Dieses Phänomen stellten wir auch in unserer Studie fest. [Karen et al., 2009], [Bennàssar et al., 2013], [Patel et al., 2007], [Gareau et al., 2009b], [Al-Arashi et al., 2007] und [Bennàssar et al., 2012] untersuchten Präparate von BZK im FM und erhielten sehr zufriedenstellende Ergebnisse. Die Ähnlichkeit mit den histologischen Bildern war groß, jedoch fehlte in diesen Studien ein Vergleich zwischen den Aufnahmen im FM und denen im RM. Diesen Vergleich der Bilder in den unterschiedlichen Modi holten wir mit unserer Studie nach. Da im RM und im FM häufig unterschiedliche, zur Diagnose führende Eigenschaften sichtbar waren, kamen wir zu dem Ergebnis, dass es stets sinnvoll ist die Präparate in beiden Modi zu untersuchen. [Bennàssar et al., 2014] erreichten in ihrer Studie eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 98% für die korrekte Diagnose von BZK.

Problematisch war auch in anderen Studien häufig die Diagnose von mikronodulären und infiltrativen BZK. [Gareau et al., 2009a], [Gareau et al., 2008] und [Longo et al., 2014] konnten zeigen, dass im Gegensatz zum RM die diagnostische Genauigkeit bei den Aufnahmen im FM fast genauso hoch ist wie in der Histologie. In den Studien von [Ziefle et al., 2010] und [Schüle et al., 2009] wurden Schnitttechniken angewandt, die in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie gebräuchlich sind. Dazu zählten die Technik der „Tübinger Torte“ und die „Muffin-Technik“. Die einzelnen Präparatscheiben wurden mit dem ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskop untersucht und auf das Vorhandensein von BZK überprüft. Anschließend wurden Sensitivität und Spezifität für die diagnostische Genauigkeit ermittelt. Wurden jeweils die verschiedenen Schnitte bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität miteinander verglichen, so fielen starke Abweichungen auf. Die Randschnitte zeigten wesentlich bessere Werte als die Bodenschnitte. Diese Untersuchungen sind sehr wichtig, da bei einer Verwendung des konfokalen Laserscanmikroskops anstelle der konventionellen Histologie weiterhin mit diesen Schnitttechniken gearbeitet werden soll. In Zukunft sollten deshalb weitere Studien durchgeführt werden um mögliche Ursachen für die Abweichungen von Sensitivität und Spezifität aufzudecken und zu versuchen einheitliche, gute Ergebnisse zu erhalten.

Eine weitere Aufgabe für die Zukunft ist es, Algorithmen für die ex-vivo KLM zu entwickeln, die zur Diagnose von BZK dienen. In der in-vivo KLM existieren bereits zahl-

reiche solcher Algorithmen. Um diese zu erstellen ist es notwendig bestimmte Merkmale festzulegen, die in den konfokalen Aufnahmen von BZK häufig zu finden sind. [Jih et al., 1999] erstellten bereits eine Liste von acht Kriterien, die spezifisch in BZK vorkommen. Eine weitere Ausarbeitung dieser Kriterien mit einer Unterteilung in Haupt- und Nebenkriterien sollte erfolgen.

Auch die Aufnahmen des PEK lieferten sehr gute Ergebnisse. Dieser Tumor konnte in den Aufnahmen des RM und FM sicher diagnostiziert werden. Innerhalb der Dermis sind die hellen Tumorstränge im FM besser zu erkennen, da sie hier einen stärkeren Kontrast mit der dunklen Umgebung bilden. Im RM erscheinen die Übergänge zwischen Tumorgewebe und Umgebung manchmal ungenau, da beide relativ hell erscheinen. Verhornungsstörungen stellen sich im RM besser dar. Hier ist das Keratin deutlich sichtbar, da es einen hohen Brechungsindex besitzt. Im FM erscheint es schwarz da die Fluoreszenzfarbstoffe keine Affinität zu Keratin besitzen. Die Kernpleomorphie der einzelnen Tumorzellen kann bei entsprechender Vergrößerung vor allem im FM gut beobachtet werden. Das Bowen-Karzinom mit seinen typischen großen, ballonförmigen Tumorarealen zeigte ebenfalls eine große morphologische Übereinstimmung mit den histologischen Aufnahmen. Die Abgrenzungen der einzelnen Tumornester sind im RM schärfer. Auch die Aufnahmen des Keratoakanthoms zeigten große Ähnlichkeiten mit den Aufnahmen in der Histologie.

Im Vergleich zum BZK wurden deutlich weniger Studien zur Eignung der KLM für die Diagnostik von PEK durchgeführt. [Rajadhyaksha et al., 2001] untersuchten neben BZK auch Präparate von PEK. Sie stellten, genau wie wir fest, dass die Auswertung der konfokalen Bilder und der histologischen Bilder fast immer zur gleichen Diagnose führt. [Chung et al., 2004] stuften in ihrer Studie die korrekte Diagnosefindung bei PEK als schwieriger ein. Grund dafür war, dass Verhornungsmuster nicht erkannt werden konnten. Der Aufbau der Studie von [Al-Arashi et al., 2007] gleicht dem Aufbau unserer Studie, da sie ebenfalls PEK in beiden Modi untersuchten und die Aufnahmen des RM und FM miteinander verglichen. Auch sie kamen zu dem Ergebnis, dass die diagnostische Genauigkeit für die Aufnahmen im FM höher war, da sich die Tumorinseln hier stärker hervorheben.

[Chung et al., 2004] äußerten in ihrer Studie über BZK bereits den Gedanken, dass die KLM ebenfalls für die postoperative Diagnostik maligner Melanome, aufgrund des hohen Brechungsindex von Melanin, eine Alternative zur konventionellen Histologie darstellen könnte. Unsere Studie ist die erste die verschiedene Subtypen von MM untersuchte. Im RM besaßen die Melanozyten eine weiße Farbe aufgrund ihres hohen Gehalts an Melanin. Im FM leuchteten sie ebenfalls hell weiß und konnten gut erkannt werden. So konnten in beiden Modi Ansammlungen von Melanozyten in der Dermis, einzelne Melanozyten und auch Melanozyten innerhalb der verschiedenen Schichten der Epidermis erkannt werden. Die Unregelmäßigkeit der gesamten Läsionen und die Asymmetrie der Epidermis und ihrer Reteleisten zeigten sich im RM und im FM. Die KLM scheint eine sehr vielversprechende Alternative oder Ergänzung zur konventionellen Histologie der MM zu sein. [Debarbieux et al., 2012] untersuchten bereits MM des Nagels mit dem ex-vivo konfokalen La-

lerscanmikroskop. Besonders bei diesem Subtyp des MM ist eine schnelle postoperative Diagnostik ein großer Fortschritt, da so auf aufwendige und für den Patienten belastende Folgeoperationen verzichtet werden kann. Es wurden Aufnahmen des ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskops mit in-vivo Aufnahmen und histologischen Aufnahmen verglichen. Generell ergab sich, wie auch in unserer Studie, eine große Übereinstimmung der optischen Auswertungen der Bilder der KLM und der Histologie. Zu Abweichungen kam es in der oben genannten Studie von [Debarbieux et al., 2012] bei Läsionen die aufgrund ihrer Lokalisation oder Invasivität mit Hilfe des in-vivo konfokalen Laserscanmikroskops nicht korrekt dargestellt werden konnten.

Davis beschrieb das MM wie folgt: „Melanome hinterlassen mit ihrer eigenen Tinte eine Nachricht auf der Haut, die für jeden von uns zu sehen ist. Viele von uns sehen sie, aber leider wird sie nur von wenigen verstanden.“ [Davis, 1985] Dies zeigt die Notwendigkeit Algorithmen auch für die ex-vivo KLM zu entwerfen mit deren Hilfe MM schneller diagnostiziert werden können. Die Algorithmen stellen sozusagen eine Art „Wörterbuch“ dar, mit Hilfe dessen die „Nachricht des MM“, wie Davis sie beschrieb, leichter identifiziert werden kann. Die Algorithmen können sich an denen der in-vivo KLM orientieren.

Die Dermatologie ist ein sehr großes Anwendungsgebiet der KLM. Grund dafür ist, dass die Exzision von Hautläsionen präoperativ gut planbar und die Präparatgewinnung relativ einfach ist. Jedoch sollte die Eignung der KLM auch für andere Gewebetypen überprüft werden, da sie für viele andere Bereiche ebenfalls eine Vereinfachung der postoperativen Diagnostik schaffen kann. In einigen Studien wurden bereits andere Gewebetypen und Organe untersucht.

Die histologische Aufarbeitung von Präparaten von Brustkrebs ist sehr aufwendig und kann bis zu zwei Tage beanspruchen. Bei einem Großteil der Patienten ist dann eine Folgeoperation notwendig, die einen großen Aufwand und hohe Kosten mit sich bringt. Wäre eine Untersuchung des frisch exzidierten Gewebes mit dem konfokalen Laserscanmikroskop innerhalb des Operationssaals möglich, könnten weitere Exzisionen sofort stattfinden. [Larson et al., 2013b], [Dobbs et al., 2013] und [Abeytunge et al., 2011] untersuchten Präparate des Brustgewebes. Konfokale Aufnahmen von gesundem und neoplastischem Gewebe wurden mit histologischen Aufnahmen verglichen. Alle drei Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die durch die KLM gestellte Verdachtsdiagnose fast immer durch die histologische Untersuchung verifiziert werden konnte und die KLM in Zukunft eine vielversprechende Alternative zur konventionellen Histologie darstellen könnte.

[Ragazzi et al., 2014] fertigen konfokale Aufnahmen von Brustgewebe, der Schilddrüse, des Kolons und der Lymphknoten an. Auch hier wurde sowohl neoplastisches als auch gesundes Gewebe untersucht. Die Übereinstimmung der morphologischen und strukturellen Eigenschaften der Histologie und der KLM war für Präparate der Brust, der Schilddrüse und des Kolons hoch. Lymphknoten waren jedoch schwer zu beurteilen, da sowohl das gesunde als auch das neoplastische Gewebe sehr viele Zellkerne enthalten. Eine Unterscheidung zwischen gesunden und tumorösen Läsionen war problematisch. Auch hier wird wieder, wie beim MM, die Notwendigkeit von spezifischen Markern für die KLM

wie in der Immunhistochemie deutlich.

In der Studie von [White et al., 2004] wurden verschiedene Präparate aus der Kopf- und Nackenregion mit Hilfe des konfokalen Laserscanmikroskops untersucht. Es wurde Gewebe aus der Schilddrüse und der Parotis gewonnen. Zusätzlich wurden Präparate der Schleimhaut, des Muskelgewebes und des Knochens beurteilt. Die Ähnlichkeit zwischen den konfokalen Aufnahmen und den histologischen Aufnahmen war sehr groß. Einige Merkmale konnten in der KLM besser dargestellt werden, andere schlechter. Ein besonders bedeutender Fortschritt ist die Darstellung von Knochen. In der Histologie ist eine Darstellung erst nach aufwendigen Entkalkungsprozessen möglich. In der Gefrierschnitt-diagnostik ist eine Darstellung von Knochen deshalb gar nicht möglich. Bisher existierte also noch keine Methode die es ermöglichte Knochen innerhalb kurzer Zeit nach der Exzision histologisch darzustellen. Die konfokalen Aufnahmen des Knochengewebes sind exakt und detailgenau. Auch für die Dermatologie ist dies bedeutsam, da Läsionen der Haut, die invasiv in den Knochen vordringen, vollständig beurteilt werden können.

Eine weitere Möglichkeit der KLM besteht darin sie intraoperativ anzuwenden um zwischen verschiedenen Gewebetypen zu unterscheiden und so Unsicherheiten in Schnittführung und -tiefe zu beseitigen. So kann auch die Operationszeit für dermatologische Läsionen verkürzt werden, da die Schnittführung schneller und sicherer erfolgen kann und Resektionsgrenzen gut bestimmbar sind.

Neben der ex-vivo KLM spielt die in-vivo KLM nach wie vor eine wichtige Rolle. Hauptanwendungsgebiet ist die präoperative Untersuchung melanozytärer Läsionen. [Pellacani et al., 2007] prüften für jede untersuchte melanozytäre Läsion das Auftreten von 37 verschiedenen Merkmalen die für die in-vivo KLM spezifisch sind. Prozentuale Häufigkeiten wurden errechnet und somit die am häufigsten auftretenden Merkmale hervorgehoben. [Pellacani et al., 2005b] entwarfen einen Algorithmus der aus zwei Haupt- und vier Nebenkriterien gebildet wird. Dieser Algorithmus diente zur Vereinfachung der Unterscheidung zwischen gutartigen und bösartigen Läsionen in der in-vivo KLM. Sensibilität und Spezifität waren mit 97% und 72% zufriedenstellend. [Guitera et al., 2012] und [Ulrich and Lange-Asschenfeldt, 2013] verwendeten bei ihrer Forschung ebenfalls diesen Algorithmus. Zusätzlich wurden hier auch BZK und AK untersucht, die mit sehr großer diagnostischer Genauigkeit erkannt werden konnten. Sensitivität und Spezifität für die korrekte Unterscheidung zwischen gutartigen und bösartigen melanozytären Läsionen lagen hier nicht ganz so hoch. [Pellacani et al., 2005a] beschränkten sich für die Unterscheidung zwischen gutartigen und bösartigen melanozytären Läsionen auf das Beurteilen der melanozytären Nester. Anhand der Form und Gestalt der Nester wurde mit großem Erfolg zwischen gutartigen und bösartigen Läsionen mit Hilfe der in-vivo Aufnahmen unterschieden. [Gill et al., 2014] verglichen histologische Aufnahmen mit Aufnahmen des in-vivo konfokalen Laserscanmikroskops und stellten große morphologische Ähnlichkeiten fest. Jedoch kamen sie ebenfalls zu dem Schluss, dass es kein Merkmal gibt, welches bei seinem Vorhandensein in den konfokalen Aufnahmen zu 100% zu einer richtigen Diagnose führt. Wurden in unserer Studie melanozytäre Präparate quer angeschnitten, so zeigte sich ein

Bild, welches den in-vivo Aufnahmen sehr stark ähnelte. Das Merkmal der sogenannten „ringed pattern“, das in der in-vivo KLM zur Unterscheidung gutartiger und bösartiger Läsionen dient, konnten wir in unseren Aufnahmen ebenfalls beobachten. Für die in-vivo KLM existieren also bereits zahlreiche Zusammenstellungen verschiedener Merkmale sowie Algorithmen die zur Diagnosefindung beitragen. Wünschenswert wäre die Erstellung einer Liste aller signifikanter Merkmale melanozytärer Läsionen auch für die Beurteilung der Aufnahmen der ex-vivo KLM. Aufgrund zu geringer Präparat-Zahlen von melanozytären Läsionen und vor allem ihrer Subtypen war die Erstellung einer solchen Liste im Rahmen unserer Studie nicht möglich.

Interessant war ebenso die Untersuchung der Wirksamkeit von „Hedgehog-Inhibitoren“ bei der Behandlung von BZK. [Maier et al., 2014] führten eine Verlaufsbeobachtung einiger Läsionen durch, die mit diesem Wirkstoff behandelt wurden. In den konfokalen Aufnahmen konnte eindeutig die Regression der Läsionen beobachtet werden. Die in-vivo KLM ermöglicht also auch die Wirkung von Medikamenten bei Läsionen der Haut über lange Zeit auf Zellniveau zu beobachten und deren Erfolg zu kontrollieren.

Der große Vorteil der in-vivo Diagnostik liegt darin, dass sie nicht invasiv ist und so die Anzahl unnötiger Biopsien verringert werden kann. Die Auflösung der Aufnahmen ist sehr hoch und entspricht der Histologie. Nachteil der in-vivo KLM ist, dass die Eindringtiefe des Laserlichts limitiert ist und die Darstellung des Gewebes horizontal statt vertikal erfolgt. Außerdem gibt es bestimmte Lokalisationen die für das in-vivo konfokale Laserscanmikroskop unerreichbar sind. All diese Punkte zeigen, dass sich die in-vivo KLM und die ex-vivo KLM sehr gut ergänzen und im klinischen Alltag bei gemeinsamer Anwendung den größtmöglichen Fortschritt mit sich bringen.

Die Dermatoskopie ist heute ein sehr häufig angewendetes diagnostisches Hilfsmittel, das zur Beurteilung von Hautveränderungen dient. Besonders melanozytäre Läsionen können gut beurteilt werden. [Argenziano et al., 1998] entwarfen eine „7-Punkt-Checkliste“ zur schnellen dermatoskopischen Beurteilung von melanozytären Läsionen um zwischen gutartigen und bösartigen Veränderungen unterscheiden zu können. Wurden Läsionen mit dieser Checkliste klassifiziert war die diagnostische Genauigkeit höher als bei der Anwendung der „ABCDE-Regel“. Die Spezifität war allerdings geringer, als bei der Beurteilung der Läsionen mit Hilfe aller bekannten dermatoskopischen Merkmale. [Ascierto et al., 2000] teilten alle untersuchten Läsionen in fünf Risikostufen ein, die entschieden, ob ein operativer Eingriff indiziert war oder nicht. Dieses Modell der Risikostufen führte zu guten Ergebnissen. [Kittler et al., 2002] erstellten eine Übersicht über die Ergebnisse aus 27 Studien, die sich mit dem Vergleich der diagnostischen Genauigkeit der Dermatoskopie und der rein visuellen Untersuchung befassten. Sensibilitäten und Spezifitäten variierten zwischen den einzelnen Studien stark. Generell zeigte sich, dass die Erfahrung den wichtigsten Faktor für das Erreichen einer hohen diagnostischen Genauigkeit darstellt. Die Anwendung von Algorithmen hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis. Selbst bei einer Optimierung aller Faktoren konnte mit der Dermatoskopie eine diagnostische Genauigkeit von 100% nicht erreicht werden. [Vestergaard et al., 2008] kamen bei dem Vergleich

zahlreicher Studien zu sehr ähnlichen Ergebnissen.

Die Dermatoskopie ist ein sehr hilfreiches präoperatives diagnostisches Hilfsmittel das sehr gut in Kombination mit der präoperativen in-vivo KLM und der postoperativen ex-vivo KLM angewendet werden kann.

Auch die optische Kohärenztomographie (OCT) ist ein diagnostisches Hilfsmittel mit dem eine hohe diagnostische Genauigkeit erzielt werden kann. [Welzel et al., 1997] untersuchten Präparate der gesunden Haut und ein Präparat eines MM. Auch hier wurden sehr zufriedenstellende Ergebnisse bei dem Vergleich mit histologischen Bildern erzielt. Eindringtiefe in die Haut und Auflösungsvermögen sind hoch. Die OCT stellt eine alternative Methode zur in-vivo KLM da, ist jedoch noch nicht ausreichend erforscht um sie vollständig in den klinischen Alltag einzubinden.

7 Zusammenfassung

Da die Inzidenz von Hautkrebs zugenommen hat und in Zukunft weiter zunehmen wird, ist eine frühzeitige und sichere Erkennung von großer Bedeutung. Die konventionelle Histologie ist heute die Untersuchungsmethode, welche die höchste postoperative diagnostische Genauigkeit besitzt und damit den Goldstandard darstellt mit dem neue Methoden verglichen werden müssen. Da die histologische Untersuchung jedoch sehr zeitaufwendig und kostenintensiv ist, wird stetig nach alternativen Methoden gesucht, die eine vergleichbare diagnostische Genauigkeit besitzen. Die ex-vivo KLM scheint eine vielversprechende, postoperative Diagnostikmethode zu sein, die in Zukunft möglicherweise zu einer wichtigen Routineuntersuchung werden und als Ergänzung zur konventionellen Histologie dienen könnte.

Ziel dieser Arbeit war es Aufnahmen des ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskops von gesunder Haut und verschiedenen Hautläsionen mit konventionellen histologischen Aufnahmen zu vergleichen und Merkmale herauszuarbeiten, mit denen ein korrekter Befund der Läsion erstellt werden kann.

Innerhalb von fünf Monaten wurden 252 Präparate frisch exzidierten Gewebes von 152 Patienten gewonnen. Dazu zählten Präparate gesunder Haut, gutartiger nicht-melanozytärer Veränderungen, gutartiger melanozytärer Veränderungen, der Präkanzerosen, semimaligner Veränderungen und maligner Veränderungen. Von diesen Präparaten wurden mit dem ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskop sowohl im RM als auch im FM Aufnahmen erstellt. Anschließend erfolgte die konventionelle histologische Untersuchung. Zwei speziell für die ex-vivo KLM geschulte Dermatologen beurteilten unabhängig voneinander die Aufnahmen, notierten morphologische Merkmale und erstellten für jede Läsion Befunde, die anschließend miteinander und mit den histologischen Befunden verglichen wurden. Im ersten Teil der Arbeit wurden die Präparate der gesunden Haut untersucht und eine Liste mit allen auftretenden Artefakten erstellt. Im zweiten Teil der Arbeit wurden mit Hilfe der gewonnenen Erkenntnisse alle pathologischen Läsionen untersucht und beurteilt.

Die Übereinstimmung der optischen Auswertungen der konfokalen Aufnahmen und der histologischen Aufnahmen war sehr groß. Schichtaufbau und morphologische Strukturen der gesunden Haut wurden in den Aufnahmen des konfokalen Laserscanmikroskops detailgenau dargestellt. Fehler in der Vorbehandlung und Vorbereitung der Präparate waren die Hauptursache für das Auftreten von Artefakten. Durch die Klärung der jeweiligen Ursache konnten Artefakte weitestgehend vermieden oder schnell als sol-

che erkannt werden.

Gutartige nicht-melanozytäre Veränderungen wurden in dieser Studie zum ersten Mal mit dem ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskop untersucht. Die Übereinstimmung der morphologischen Merkmale der konfokalen Bilder mit den histologischen Aufnahmen war sehr hoch. Eine genaue Beschreibung der gutartigen melanozytären Veränderungen war notwendig um zwischen diesen und dem MM unterscheiden zu können. Da die morphologischen Merkmale klar zu erkennen waren und die Melanozyten besonders kontrastreich abgebildet wurden, konnten melanozytäre Läsionen schnell erkannt werden. Eine korrekte Beurteilung und Unterscheidung zwischen den gutartigen und bösartigen melanozytären Hautveränderungen war ebenfalls möglich, jedoch waren dafür Erfahrung bei der Interpretation der konfokalen Bilder, sowie histopathologische Kenntnisse eine Voraussetzung. Die morphologischen und strukturellen Ähnlichkeiten der konfokalen Aufnahmen der Präkanzerosen, des BZK und des PEK der Haut und der entsprechenden histologischen Befunde und Aufnahmen waren ebenfalls sehr groß. Durch den hohen Brechungsindex des Keratins konnten das PEK der Haut und seine Präkanzerosen im RM leicht erkannt werden. Die Tumorinseln der BZK bildeten durch ihr helles Leuchten im RM und im FM einen starken Kontrast zu ihrer Umgebung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in unserer Studie mit dem neuesten derzeit verfügbaren ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskop gearbeitet wurde, welches das Scannen von großen Flächen bis zu 20,8 x 20,8mm in nur sieben Minuten ermöglichte und die Option bereitstellte zwischen drei verschiedenen Laserwellenlängen frei zu wählen. Außerdem haben wir eine große Anzahl von Präparaten untersucht die ein sehr breites Spektrum an verschiedenen dermatologischen Läsionen abdeckten. In unserer Studie wurden zum ersten Mal die ex-vivo konfokalen Aufnahmen gesunder Haut morphologisch detailliert beschrieben und eine Übersicht über alle in der ex-vivo KLM auftretenden Artefakte erstellt. Ebenfalls zählt diese Studie zu einer der ersten in der nicht-melanozytäre gutartige, melanozytäre gutartige und melanozytäre bösartige Hautveränderungen mit Hilfe des ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskops untersucht und beschrieben wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten kürzlich in einem internationalen Journal veröffentlicht werden. [Hartmann et al., 2015b].

Ziel nachfolgender Studien sollte es sein, zahlreiche Präparate operativ entfernter Hautveränderungen, aber auch anderer Gewebearten mit dem ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskop zu untersuchen und Sensitivitäten und Spezifitäten zu ermitteln. Die Entwicklung leistungsfähiger Mikroskope mit erhöhter Scangeschwindigkeit, die in noch kürzerer Zeit das Scannen noch größerer Präparate erlauben, würde einen weiteren Fortschritt bedeuten. Erst wenn mit Hilfe der ex-vivo KLM eine gleiche oder noch höhere diagnostische Genauigkeit erzielt wird wie mit der konventionellen histologische Untersuchung, kann die ex-vivo KLM als zuverlässiges Routinediagnostikum eingesetzt werden.

Literaturverzeichnis

- [Abeytunge et al., 2011] Abeytunge, S., Li, Y., Larson, B., Toledo-Crow, R., und Rajadhyaksha, M. (2011). Rapid confocal imaging of large areas of excised tissue with strip mosaicing. *Journal of biomedical optics*, 16(5):050504.
- [Ackerman and Mones, 2006] Ackerman, A. B. und Mones, J. M. (2006). Solar (actinic) keratosis is squamous cell carcinoma. *The British journal of dermatology*, 155(1):9–22.
- [Al-Arashi et al., 2007] Al-Arashi, M. Y., Salomatina, E., und Yaroslavsky, A. N. (2007). Multimodal confocal microscopy for diagnosing nonmelanoma skin cancers. *Lasers in surgery and medicine*, 39(9):696–705.
- [Argenziano et al., 1998] Argenziano, G., Fabbrocini, G., Carli, P., Giorgi, V., Sammarco, E., und Delfino, M. (1998). Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. Comparison of the ABCD rule of dermatoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis. *Archives of dermatology*, 134(12):1563–1570.
- [Ascierto et al., 2000] Ascierto, P. A., Palmieri, G., Celentano, E., Parasole, R., Caracò, C., Daponte, A., Chiofalo, M. G., Melucci, M. T., Mozzillo, N., Satriano, R. A., und Castello, G. (2000). Sensitivity and specificity of epiluminescence microscopy: evaluation on a sample of 2731 excised cutaneous pigmented lesions. The Melanoma Cooperative Study. *The British journal of dermatology*, 142(5):893–898.
- [Augustin et al., 2010] Augustin, M., Jung, E. G., und Moll, I. (2010). *Dermatologie*. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart, 7. Auflage.
- [Bennàssar et al., 2013] Bennàssar, A., Carrera, C., Puig, S., Vilalta, A., und Malvehy, J. (2013). Fast evaluation of 69 basal cell carcinomas with ex vivo fluorescence confocal microscopy: criteria description, histopathological correlation, and interobserver agreement. *JAMA dermatology*, 149(7):839–847.
- [Bennàssar et al., 2012] Bennàssar, A., Vilalta, A., Carrera, C., Puig, S., und Malvehy, J. (2012). Rapid diagnosis of two facial papules using ex vivo fluorescence confocal microscopy: toward a rapid bedside pathology. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*, 38(9):1548–1551.
- [Bennàssar et al., 2014] Bennàssar, A., Vilata, A., Puig, S., und Malvehy, J. (2014). Ex vivo fluorescence confocal microscopy for fast evaluation of tumour margins during Mohs surgery. *The British journal of dermatology*, 170(2):360–365.

- [Berking et al., 2014] Berking, C., Hauschild, A., Kölbl, O., Mast, G., und Gutzmer, R. (2014). Basalzellkarzinom – Therapieoptionen für den häufigsten Hautkrebs. *Deutsches Ärzteblatt international*, 111(22):389–395.
- [Bini et al., 2011] Bini, J., Spain, J., Nehal, K., Hazelwood, V., DiMarzio, C., und Rajadhyaksha, M. (2011). Confocal mosaicing microscopy of human skin ex vivo: spectral analysis for digital staining to simulate histology-like appearance. *Journal of biomedical optics*, 16(7):076008.
- [Bowen, 1983] Bowen, J. T. (1983). Precancerous dermatoses: A study of two cases of chronic atypical epithelial proliferation. *Archives of dermatology*, 119.
- [Breuninger et al., 2013] Breuninger, H., Eigentler, T., Bootz, F., Hauschild, A., Kortmann, R., Wolff, K., Stockfleth, E., Szeimies, R., Rompel, R., Garbe, C., und Grabbe, S. (2013). Brief S2k guidelines–Cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 11 Suppl 3:37–45, 39–47.
- [Chang et al., 2013] Chang, T. C., Liu, J., und Liao, J. C. (2013). Probe-based confocal laser endomicroscopy of the urinary tract: the technique. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (71).
- [Chronopoulos et al., 2010] Chronopoulos, E., Nikolaos, P., Karanikas, C., Kalliakmanis, A., Plessas, S., Neofytou, I., Laspas, F., Tzovara, I., und Chalazonitis, A. (2010). Patient presenting with lipoma of the index finger: a case report. *Cases journal*, 3:20.
- [Chung et al., 2004] Chung, V. Q., Dwyer, P. J., Nehal, K. S., Rajadhyaksha, M., Menaker, G. M., Charles, C., und Jiang, S. B. (2004). Use of ex vivo confocal scanning laser microscopy during Mohs surgery for nonmelanoma skin cancers. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*, 30(12 Pt 1):1470–1478.
- [Cremer and Cremer, 1978] Cremer, C. und Cremer, T. (1978). Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field. *Microscopica acta*, 81(1):31–44.
- [Davis, 1985] Davis, N. C. (1985). Melanoma: issues of importance to the clinician. *British journal of hospital medicine*, 33(3):166–170.
- [Debarbieux et al., 2012] Debarbieux, S., Hospod, V., Depaepe, L., Balme, B., Poulalhon, N., und Thomas, L. (2012). Perioperative confocal microscopy of the nail matrix in the management of in situ or minimally invasive subungual melanomas. *The British journal of dermatology*, 167(4):828–836.
- [Dobbs et al., 2013] Dobbs, J. L., Ding, H., Benveniste, A. P., Kuerer, H. M., Krishnamurthy, S., Yang, W., und Richards-Kortum, R. (2013). Feasibility of confocal fluorescence microscopy for real-time evaluation of neoplasia in fresh human breast tissue. *Journal of biomedical optics*, 18(10):106016.

- [Fartasch et al., 2012] Fartasch, M., Diepgen, T. L., Schmitt, J., und Drexler, H. (2012). The relationship between occupational sun exposure and non-melanoma skin cancer: clinical basics, epidemiology, occupational disease evaluation, and prevention. *Deutsches Ärzteblatt international*, 109(43):715–720.
- [Fraschini et al., 1981] Fraschini, A., Pellicciari, C., Biggiogera, M., und Manfredi Romagnini, M. G. (1981). The effect of different fixatives on chromatin: Cytochemical and ultrastructural approaches. *The Histochemical Journal*, 13(5):763–779.
- [Gareau et al., 2009a] Gareau, D. S., Karen, J., Dusza, S. W., Tudisco, M., Nehal, K. S., und M., R. (2009a). Sensitivity and specificity for detecting basal cell carcinomas in Mohs excisions with confocal fluorescence mosaicing microscopy. *Journal of biomedical optics*, 14(3):034012.
- [Gareau et al., 2008] Gareau, D. S., Li, Y., Huang, B., Eastman, Z., Nehal, K. S., und Rajadhyaksha, M. (2008). Confocal mosaicing microscopy in mohs skin excisions: feasibility of rapid surgical pathology. *Journal of biomedical optics*, 13(5):054001.
- [Gareau et al., 2009b] Gareau, D. S., Patel, Y. G., Li, Y., Aranda, I., Halpern, A. C., Nehal, K. S., und Rajadhyaksha, M. (2009b). Confocal mosaicing microscopy in skin excisions: a demonstration of rapid surgical pathology. *Journal of microscopy*, 233(1):149–159.
- [GEKID e.V., 2014] GEKID e.V. (2014). Atlas der Krebsinzidenz und -mortalität in Deutschland (GEKID-Atlas). verfügbar über: www.gekid.de, zuletzt zugegriffen am 22.01.2016.
- [Gill et al., 2014] Gill, M., Longo, C., Farnetani, F., Cesinaro, A. M., González, S., und Pellacani, G. (2014). Non-invasive in vivo dermatopathology: identification of reflectance confocal microscopic correlates to specific histological features seen in melanocytic neoplasms. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 28(8):1069–1078.
- [Glogau, 2000] Glogau, R. G. (2000). The risk of progression to invasive disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(1 Pt 2):23–24.
- [Guitera et al., 2012] Guitera, P., Menzies, S. W., Longo, C., Cesinaro, A. M., Scolyer, R. A., und Pellacani, G. (2012). In vivo confocal microscopy for diagnosis of melanoma and basal cell carcinoma using a two-step method: analysis of 710 consecutive clinically equivocal cases. *The Journal of investigative dermatology*, 132(10):2386–2394.
- [Hartmann et al., 2015a] Hartmann, D., Ruini, C., Mathemeier, L., Dietrich, A., Ruzicka, T., Berking, C., und von Braunmühl, T. (2015a). Ex-vivo konfokale Laserscanmikroskopie: Hauptmerkmale gesunder Haut und melanozytärer Tumoren in Korrelation mit konventioneller Histologie. *Poster anlässlich des 25. Deutschen Hautkrebskongresses der Arbeitsgemeinschaft dermatologischer Onkologie in München*.

- [Hartmann et al., 2015b] Hartmann, D., Ruini, C., Mathemeier, L., Dietrich, A., Ruzicka, T., und Braunmühl, T. v. (2015b). Identification of ex-vivo confocal scanning microscopic features and their histological correlates in human skin. *Journal of biophotonics*.
- [Hauschild et al., 2008] Hauschild, A., Breuninger, H., Kaufmann, R., Kortmann, R., Schwipper, V., Werner, J., Reifenberger, J., Dirschka, T., und Garbe, C. (2008). Short German guidelines: basal cell carcinoma. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 6 Suppl 1:S2–4.
- [Hauschild et al., 2011] Hauschild, A., Egberts, F., Garbe, C., Bauer, J., Grabbe, S., Hamm, H., Kerl, H., Reusch, M., Rompel, R., und Schlaeger, M. (2011). Melanocytic nevi. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9(9):723–734.
- [Hofmann-Wellenhof et al., 2012] Hofmann-Wellenhof, R., Pellacani, G., Malvehy, J., und Soyer, H. P. (2012). *Reflectance confocal microscopy for skin diseases*. Springer, Berlin and New York.
- [Iimori et al., 2007] Iimori, Y., Saze, M., und Ishiguro, M. (2007). *Verfahren zur Fluoreszenzfärbung von Gewebe*. Number DE102007003873A1. Pentax Corp., Tokyo, JP.
- [Jih et al., 1999] Jih, D. M., Lyle, S., Elenitsas, R., Elder, D. E., und Cotsarelis, G. (1999). Cytokeratin 15 expression in trichoepitheliomas and a subset of basal cell carcinomas suggests they originate from hair follicle stem cells. *Journal of cutaneous pathology*, 26(3):113–118.
- [Karen et al., 2009] Karen, J. K., Gareau, D. S., Dusza, S. W., Tudisco, M., Rajadhyaksha, M., und Nehal, K. S. (2009). Detection of basal cell carcinomas in mohs excisions with fluorescence confocal mosaicing microscopy. *The British journal of dermatology*, 160(6):1242–1250.
- [Kempf et al., 2007] Kempf, W., Hantschke, M., Kutzner, H., und Burgdorf, W. (2007). *Dermatopathologie*. Steinkopff Verlag Darmstadt, Darmstadt.
- [Kittler et al., 2002] Kittler, H., Pehamberger, H., Wolff, K., und Binder, M. (2002). Diagnostic accuracy of dermoscopy. *The Lancet. Oncology*, 3(3):159–165.
- [Larson et al., 2013a] Larson, B., Abeytunge, S., Seltzer, E., Rajadhyaksha, M., und Nehal, K. (2013a). Detection of skin cancer margins in Mohs excisions with high-speed strip mosaicing confocal microscopy: a feasibility study. *The British journal of dermatology*, 169(4):922–926.
- [Larson et al., 2013b] Larson, B. A., Abeytunge, S., Murray, M., Rajadhyaksha, M., Alfano, R. R., und Demos, S. G. (2013b). Large area mapping of excised breast tissue by fluorescence confocal strip scanning: a preliminary feasibility study. In *SPIE BiOS*, SPIE Proceedings, page 857706. SPIE.

- [LeBoit, 2006] LeBoit, P. E. (2006). *Pathology and genetics of skin tumours*. World Health Organization classification of tumours. IARC Press, Lyon.
- [Li et al., 2005] Li, Y., Gonzalez, S., Terwey, T. H., Wolchok, J., Li, Y., Aranda, I., Toledo-Crow, R., und Halpern, A. C. (2005). Dual mode reflectance and fluorescence confocal laser scanning microscopy for in vivo imaging melanoma progression in murine skin. *The Journal of investigative dermatology*, 125(4):798–804.
- [Longo et al., 2013] Longo, C., Ragazzi, M., Castagnetti, F., Gardini, S., Palmieri, T., Lallas, A., Moscarella, E., Piana, S., Pellacani, G., Zalaudek, I., und Argenziano, G. (2013). Inserting ex vivo fluorescence confocal microscopy perioperatively in Mohs micrographic surgery expedites bedside assessment of excision margins in recurrent basal cell carcinoma. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 227(1):89–92.
- [Longo et al., 2014] Longo, C., Rajadhyaksha, M., Ragazzi, M., Nehal, K., Gardini, S., Moscarella, E., Lallas, A., Zalaudek, I., Piana, S., Argenziano, G., und Pellacani, G. (2014). Evaluating ex vivo fluorescence confocal microscopy images of basal cell carcinomas in Mohs excised tissue. *The British journal of dermatology*, 171(3):561–570.
- [Maier et al., 2014] Maier, T., Kulichova, D., Ruzicka, T., und Berking, C. (2014). Noninvasive monitoring of basal cell carcinomas treated with systemic hedgehog inhibitors: pseudocysts as a sign of tumor regression. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(4):725–730.
- [MAVIG GmbH, 2014] MAVIG GmbH (2014). *Vivascope Multilaser*. Unveröffentlichtes Manuskript.
- [Megahed, 2012] Megahed, M. (2012). Histologie UV-Licht-bedingter maligner Hauttumore. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 63(10):778–787.
- [Minsky, 1957] Minsky, M. (1957). *Microscopy Apparatus*. Number US3013467 A. Google Patents.
- [Moser et al., 2014] Moser, S., Borm, J., Mihic-Probst, D., Jacobsen, C., und Kruse Gujer, Astrid L (2014). Metastatic basal cell carcinoma: report of a case and review of the literature. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 117(2):79–82.
- [Munde et al., 2013] Munde, P. B., Khandekar, S. P., Dive, A. M., und Sharma, A. (2013). Pathophysiology of merkel cell. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, 17(3):408–412.
- [Nehal et al., 2008] Nehal, K. S., Gareau, D., und Rajadhyaksha, M. (2008). Skin imaging with reflectance confocal microscopy. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 27(1):37–43.

- [Patel et al., 2007] Patel, Y. G., Nehal, K. S., Aranda, I., Li, Y., Halpern, A. C., und Rajadhyaksha, M. (2007). Confocal reflectance mosaicing of basal cell carcinomas in Mohs surgical skin excisions. *Journal of biomedical optics*, 12(3):034027.
- [Pellacani et al., 2005a] Pellacani, G., Cesinaro, A. M., und Seidenari, S. (2005a). In vivo confocal reflectance microscopy for the characterization of melanocytic nests and correlation with dermoscopy and histology. *The British journal of dermatology*, 152(2):384–386.
- [Pellacani et al., 2005b] Pellacani, G., Cesinaro, A. M., und Seidenari, S. (2005b). Reflectance-mode confocal microscopy of pigmented skin lesions–improvement in melanoma diagnostic specificity. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(6):979–985.
- [Pellacani et al., 2007] Pellacani, G., Guitera, P., Longo, C., Avramidis, M., Seidenari, S., und Menzies, S. (2007). The impact of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnostic accuracy of melanoma and equivocal melanocytic lesions. *The Journal of investigative dermatology*, 127(12):2759–2765.
- [Pflugfelder et al., 2013] Pflugfelder, A., Kochs, C., Blum, A., Capellaro, M., Czeschik, C., Dettenborn, T., Dill, D., Dippel, E., Eigentler, T., Feyer, P., Follmann, M., Frerich, B., Ganten, M., Gärtner, J., Gutzmer, R., Hassel, J., Hauschild, A., Hohenberger, P., Hübner, J., Kaatz, M., Kleeberg, U. R., Kölbl, O., Kortmann, R., Krause-Bergmann, A., Kurschat, P., Leiter, U., Link, H., Loquai, C., Löser, C., Mackensen, A., Meier, F., Mohr, P., Möhrle, M., Nashan, D., Reske, S., Rose, C., Sander, C., Satzger, I., Schiller, M., Schlemmer, H., Strittmatter, G., Sunderkötter, C., Swoboda, L., Trefzer, U., Voltz, R., Vordermark, D., Weichenthal, M., Werner, A., Wesselmann, S., Weyergraf, A. J., Wick, W., Garbe, C., und Schadendorf, D. (2013). Malignant melanoma S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma". *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 11 Suppl 6:1–116, 1–126.
- [Plewig et al., 2012] Plewig, G., Lanthaler, M., Burgdorf, M., Hertl, M., und Ruzika, T. (2012). *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. Springer, Berlin, 6. Auflage.
- [Ragazzi et al., 2014] Ragazzi, M., Piana, S., Longo, C., Castagnetti, F., Foroni, M., Ferrari, G., Gardini, G., und Pellacani, G. (2014). Fluorescence confocal microscopy for pathologists. *Modern Pathology*, 27(3):460–471.
- [Rajadhyaksha et al., 2001] Rajadhyaksha, M., Menaker, G., Flotte, T., Dwyer, P. J., und González, S. (2001). Confocal examination of nonmelanoma cancers in thick skin excisions to potentially guide Mohs micrographic surgery without frozen histopathology. *The Journal of investigative dermatology*, 117(5):1137–1143.

- [Schüle et al., 2009] Schüle, D., Breuninger, H., Schippert, W., Dietz, K., und Moehrle, M. (2009). Confocal laser scanning microscopy in micrographic surgery (three-dimensional histology) of basal cell carcinomas. *The British journal of dermatology*, 161(3):698–700.
- [Sellheyer, 2011] Sellheyer, K. (2011). Basalzellkarzinom und Stammzellmarker: Beitrag zur möglichen Histogenese? *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 62(2):119–127.
- [Stockfleth et al., 2012] Stockfleth, E., Terhorst, D., Hauschild, A., Zouboulis, C. C., Schläger, M., Oster-Schmidt, C., Diepgen, T., Garbe, C., Gollnick, H., Korting, C., Merk, H., Sterry, W., Kerl, H., und Berking, C. (2012). Leitlinie zur Behandlung der aktinische Keratosen. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 10 Suppl 7:S1–23.
- [Telfer et al., 2008] Telfer, N. R., Colver, G. B., und Morton, C. A. (2008). Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *The British journal of dermatology*, 159(1):35–48.
- [Terhorst, 2009] Terhorst, D. (2009). *Basics Dermatologie*. Basics. Elsevier, Urban & Fischer, München, 2. Auflage.
- [Thompson et al., 1993] Thompson, S. C., Jolley, D., und Marks, R. (1993). Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. *The New England journal of medicine*, 329(16):1147–1151.
- [Ulrich and Lange-Asschenfeldt, 2013] Ulrich, M. und Lange-Asschenfeldt, S. (2013). In vivo confocal microscopy in dermatology: from research to clinical application. *Journal of biomedical optics*, 18(6):061212.
- [Vestergaard et al., 2008] Vestergaard, M. E., Macaskill, P., Holt, P. E., und Menzies, S. W. (2008). Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *The British journal of dermatology*, 159(3):669–676.
- [Welzel et al., 1997] Welzel, J., Lankenau, E., Birngruber, R., und Engelhardt, R. (1997). Optical coherence tomography of the human skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 37(6):958–963.
- [White et al., 2004] White, W. M., Baldassano, M., Rajadhyaksha, M., Gonzalez, S., Tearney, G. J., Anderson, R. R., und Fabian, R. L. (2004). Confocal reflectance imaging of head and neck surgical specimens. a comparison with histologic analysis. *Archives of otolaryngology–head & neck surgery*, 130(8):923–928.
- [Wilhelm et al., 2001] Wilhelm, S., Gröbler, B., Gluch, M., und Heinz, H. (2001). Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie. *Carl Zeiss AG*. verfügbar über: www.cai.hhu.de/fileadmin/redaktion/Fakultaeten/Mathematisch-Naturwissenschaftliche_Fakultaet/CAI/Literatur/

Die_konfokale_Laser_Scanning_Mikroskopie.pdf, zuletzt zugegriffen am 22.01.2016.

- [Wolff and Kunte, 1999] Wolff, H. und Kunte, C. (1999). *Diagnostik und Therapie von Haarerkrankungen*. UNI-MED science. UNI-MED, Bremen.
- [Zargaran and Baghaei, 2014] Zargaran, M. und Baghaei, F. (2014). A clinical, histopathological and immunohistochemical approach to the bewildering diagnosis of keratoacanthoma. *Journal of dentistry (Shiraz, Iran)*, 15(3):91–97.
- [Ziefle et al., 2010] Ziefle, S., Schüle, D., Breuninger, H., Schippert, W., und Moehrle, M. (2010). Confocal laser scanning microscopy vs 3-dimensional histologic imaging in basal cell carcinoma. *Archives of dermatology*, 146(8):843–847.